

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**EL PAPEL DE LA EXPRESIÓN DE ALDH1 Y
CD133 COMO MARCADORES DE CÉLULA
MADRE TUMORAL EN EL CÁNCER DE
PULMÓN NO MICROCÍTICO ESTADIO I**

TESIS DOCTORAL

Ana López González

2014

DEDICATORIA

A mis padres...

Tú me enseñaste a elegir la mejor bata blanca, por la rodilla, holgada pero no demasiado ancha; el mejor fonendo, no muy largo para no perder calidad; y el mejor principio, *primum non nocere*. Me enseñaste a sentarme en la cama de los pacientes y a mantener siempre los oídos más abiertos que la boca. Hoy tengo la suerte de llevarte conmigo siempre, cuando me siento insegura, cuando necesito llorar con alguien o cuando me apetece sonreír. Hoy cumplo otro de los sueños de ambos, hoy siento tu abrazo lleno de orgullo. Porque hoy y siempre sé que viajas conmigo en esta aventura que es vivir. Gracias por inculcarme el amor por la Medicina, el valor de tener una gran familia y el respeto hacia mis compañeros. Te echo mucho de menos.

Y porque al lado de un gran hombre siempre hay una gran mujer. Una gran mujer dispuesta a olvidarse de sí misma para dedicarse al cuidado de los demás, sin importar el día o la hora. La responsable de mi carácter, a la que debo mi fortaleza y mi capacidad de seguir. Nunca podremos agradecerte lo suficiente tu dedicación absoluta a esta familia. Ojalá algún día sepa hacerlo tan bien como tú.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Clara, por su ayuda desinteresada, por su risa y su sonrisa contagiosas, por dejarme crecer a su imagen y semejanza, y por enseñarme lo que es la libertad.

Gracias a mis directores de tesis; a Carlos por dejarme formar parte de esa gran familia que se gestó en un pequeño despacho en el Hospital La Princesa, por creer siempre en mí, por tu cariño y por empeñarte en que esto fuera una realidad. A Mariano por aquella pequeña regañina de la que tanto aprendí, por confiar en mis posibilidades, por dejar una puerta abierta y por enseñarme a trabajar con rigor. He tenido los mejores profesores que una estudiante de Medicina y una residente de Oncología pudiera tener y, en gran parte, gracias a los dos, me he convertido en lo que soy hoy.

Gracias a Pablo, por hacer mi vida más fácil, por entender que necesitaba convertir este sueño en un proyecto terminado, porque a veces vivir con una oncóloga no es fácil, por quererme tanto y porque la vida contigo es una caja llena de sorpresas.

Gracias a mi abuela, por enseñarme que siempre puedes volver a ponerte de pie.

Gracias a Eva, por hacerme creer que sé algo de estadística, por tu inquietud y por las ganas que le has puesto a este trabajo.

Gracias a Diego, a Graci, a Cristina y a Nieves porque sin ellos no podría haber escrito ni una sola línea de este libro. Gracias por hacer vuestra mi ilusión, por ser estrictos en el trabajo y por ser grandes profesionales.

Gracias a Alberto, por tantas y tantas cosas; en este caso, gracias por todas las gestiones burocráticas, por las idas y venidas a la facultad, y por no importarte absolutamente nada ayudarme.

Gracias a mis hermanos y a mis cuñados, a ese clan que llaman algunos, porque unos sin otros no existimos, porque es una suerte contar con semejante piña y porque sé que esta tesis es tan importante para vosotros como para mí. Gracias a mis sobrinos por mantener la sonrisa en mi cara, algún día entenderéis lo importantes que sois.

Gracias a las gordas, por estar siempre del otro lado del teléfono, por todas las palabras de aliento y de confianza, por no dudar nunca de que algún día terminaría este trabajo, por lo que nos reímos juntas y por la sinceridad que reina en nuestra amistad. Gracias a todos mis amigos por el cariño que me tenéis, sincero y desinteresado, por aguantar en ocasiones mi mal carácter, y por compartir conmigo los momentos de desasosiego a la hora de elaborar esta tesis.

Gracias a mis compañeros de trabajo, por facilitarme mis horas de hospital y por brindarme siempre una mano. Gracias a Susana por ayudarme a coger aire cada mañana.

Y sobre todo, gracias a todos los pacientes que han hecho posible la realización de éste y tantos otros trabajos de investigación, porque sin vosotros la ciencia continuaría en el kilómetro de salida.

INDICE

1. RESUMEN	- 2 -
2. INTRODUCCIÓN	- 2 -
3. OBJETIVOS	- 11 -
4. MATERIAL Y MÉTODOS	- 12 -
5. RESULTADOS	- 16 -
5.1. Identificación de Células madre tumorales mediante la expresión inmunohistoquímica de ALDH1 y CD133	- 17 -
5.2. Cuantificación y valoración de los patrones de expresión de ALDH1 y CD133	- 20 -
5.3. Análisis de los patrones de expresión con las distintas variables clinicopatológicas (sexo, edad, hábito tabáquico, tipo histológico, grado de diferenciación, tamaño tumoral, invasión de pleura visceral, recurrencia y desarrollo de segundos tumores) y con la supervivencia (libre de enfermedad y global).....	- 24 -
5.4. Análisis de la relación entre expresión de ALDH1 y CD133 con mutaciones en EGFR en adenocarcinomas	- 42 -
6. DISCUSIÓN.....	- 49 -
6.1. Identificación de células madre tumorales mediante el estudio de la expresión de ALDH1 y CD133	- 49 -
6.1.1. Células madre tumorales en cáncer de pulmón:	- 49 -
6.1.2. La familia enzimática aldehído deshidrogenasa:	- 51 -
6.1.3. CD133	- 60 -
6.1.4. Co-expresión entre ALDH1 y CD133.....	- 63 -
6.2. Cuantificación y valoración de los patrones de expresión de ALDH1 y CD133	- 65 -
6.3. Análisis de los patrones de expresión con las distintas variables clinicopatológicas y con la supervivencia.	- 67 -
6.3.1. Expresión nuclear de ALDH1	- 67 -
6.3.2. Expresión citoplasmática de ALDH1	- 67 -
6.3.3. Expresión de CD133	- 72 -
6.4. Análisis de la relación entre expresión de ALDH1 y CD133 con mutaciones en EGFR en adenocarcinomas	- 75 -
7. CONCLUSIONES	- 82 -
8. BIBLIOGRAFÍA	- 83 -

1. RESUMEN

Un 70% de los pacientes con cáncer de pulmón no células pequeñas (NSCLC) estadio I fallecen de su enfermedad en los primeros cinco años del diagnóstico. Hoy en día se aplican únicamente criterios clínicos a la hora de decidir la indicación de tratamiento adyuvante con quimioterapia tras la cirugía. Buscando otros factores pronósticos, se han descrito como factores de mal pronóstico las células madre tumorales (CMT). Se trata de un grupo de células con capacidad tumorigénica, de autorrenovación y de diferenciación, así como de recidiva y migración. Dos de los marcadores utilizados para identificar estas CMT son la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1) y el CD133.

Hemos realizado un estudio retrospectivo en 78 pacientes intervenidos de un NSCLC estadio I en pacientes del Hospital Universitario Puerta de Hierro entre los años 2004 y 2009 que no hubieran recibido tratamiento adyuvante con quimioterapia, y con un tiempo mínimo de seguimiento de 24 meses. Determinamos mediante técnicas de inmunohistoquímica la expresión de ALDH1 y CD133, así como las mutaciones EGFR en los adenocarcinomas. Analizamos la relación entre ALDH1 y CD133 con las distintas variables clinicopatológicas, así como con la supervivencia de estos pacientes.

Encontramos diferencias entre los dos marcadores con los distintos subtipos histológicos, siendo la expresión de ALDH1 más frecuente en los carcinomas escamosos y del CD133 exclusivo en los adenocarcinomas. No encontramos co-expresión de los dos marcadores de CMT en ninguno de los casos que analizamos. Tampoco encontramos asociación entre la expresión de ALDH1 y CD133 y otros factores de mal pronóstico, como son el alto grado de diferenciación, el tamaño tumoral o la invasión de la pleura visceral. Además, no observamos diferencias en la supervivencia de los pacientes en función de la expresión de ALDH1 y CD133. Describimos por primera vez la expresión nuclear de ALDH1 y su probable relación con un mejor pronóstico en estos pacientes. Por otra parte, la tasa de mutaciones del EGFR es similar a la descrita en individuos con enfermedad metastásica, sin encontrar tampoco relación con la expresión de ALDH1 y CD133. Por todo ello, podemos afirmar que la combinación del análisis inmunohistoquímico de ALDH1 y CD133 en NSCLC estadio I no puede utilizarse para identificar CMT.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es el tumor más frecuente en todo el mundo, exceptuando el de la piel, con aproximadamente 1.400.000 nuevos casos al año. Representa el 16,6% de todos los tumores de los hombres y el 7,6% de las mujeres.

El 55% de los pacientes con cáncer de pulmón se diagnostican en un estadio avanzado, un 30% presentan invasión ganglionar regional y solo un 15% lo hacen en estadio precoz, siendo la cirugía el tratamiento de elección para este último grupo de pacientes.

Un 40% de los pacientes sobreviven más de cinco años tras la cirugía¹, pero la mayoría fallecen con enfermedad sistémica. La recidiva local tiene lugar en un 5-20% de los pacientes dependiendo del estadio anatomopatológico del tumor². Un 50% de las recurrencias se diagnostican en los primeros 24 meses tras el tratamiento curativo y más del 90% en los primeros cinco años³.

El carcinoma no células pequeñas de pulmón supone el 85% de los casos del total de cánceres de pulmón y los principales tipos histológicos son el carcinoma escamoso y el adenocarcinoma. En los últimos años, la incidencia de estos subtipos ha cambiado, observándose un aumento en el número de casos de adenocarcinoma. El cambio en el hábito tabáquico se ha apuntado como un posible agente causal.

Asistimos al desarrollo de marcadores pronósticos y predictores de respuesta en la enfermedad avanzada, como son la sobreexpresión y la

presencia de mutaciones del EGFR, la sobreexpresión del HER2/neu o, más recientemente, la translocación de ALK.

En el año 1995 se publicó el primer metaanálisis que demostró un beneficio absoluto del 5% al añadir quimioterapia a la cirugía, un 2% a la radioterapia radical y un 10% al tratamiento paliativo⁴

Tanto en los estadios II como en el IIIA, está indicado el tratamiento adyuvante con quimioterapia basada en platinos, con beneficio tanto en la supervivencia libre de progresión como en la supervivencia global.

Más discutido es el tratamiento adyuvante del estadio I. Ni el metaanálisis LACE (Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation), ni ninguno de los ensayos clínicos randomizados más importantes publicados recientemente (National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group JBR.10, NCIC-CTG JBR-10; Adjuvant Navelbine International Trialist Association trial, ANITA; International Adjuvant Lung Cancer Trial, IALT; Adjuvant Lung Project Italy, ALPI) han demostrado un beneficio significativo en el tratamiento de estos pacientes con platinos (HR 0.93; 95% CI 0.78 - 1.10).

El ensayo clínico 9633 Cancer and Leukemia Group B (CALGB) se realizó únicamente sobre pacientes en estadio IB; tampoco se observó un beneficio en la supervivencia global con el tratamiento adyuvante con carboplatino/paclitaxel (HR 0.80; p=0.10). Sin embargo, hubo un subgrupo de pacientes que parecía beneficiarse del tratamiento tanto en términos de supervivencia libre de progresión como en supervivencia global (HR 0.62; 90% CI 0.44-0.89 y HR 0.66; 90% CI 0.045-0.97 respectivamente), y eran los tumores con un T igual o mayor de cuatro centímetros⁵

Por tanto, creemos que son necesarios otros criterios, aparte del tamaño del tumor, a la hora de indicar o no un tratamiento adyuvante en los estadios I. Para ello es crucial conocer de forma más profunda la biología de esta enfermedad y de los factores responsables de la recidiva, la persistencia tumoral o las metástasis. En este contexto, los avances y nuevos descubrimientos de la biología tumoral han demostrado que en muchos tumores, incluidos los de pulmón, se identifican células con propiedades de célula madre tumoral (CMT)⁶

El concepto de la existencia de células madre (CM) que dieran lugar a tumores se propuso hace tiempo pero sólo recientemente se ha podido probar esta hipótesis. Según ésta, los tumores estarían formados, por un lado, por una subpoblación de células indiferenciadas, poco numerosas y con características de células madre como: capacidad de autorrenovación, capacidad tumorogénica, capacidad de diferenciación, resistencia terapéutica (quimio/radiorresistencia) y capacidad de recurrencia y metástasis. Por otro lado, la mayor parte de la masa tumoral estaría constituida por una gran población celular de progenie diferenciada proveniente de la anterior. Estas células carecerían de capacidad tumorogénica. La primera vez que se obtuvo una evidencia experimental que sustentara la existencia de CMT fue en 1997 en la leucemia mieloide aguda humana⁷

Posteriormente, este concepto se ha ido extendiendo a los tumores sólidos. Se han observado células madre tumorales (CMT) en tumores malignos de la mama, del SNC, cáncer de próstata, melanoma, mieloma múltiple, adenocarcinoma de colon, cáncer de páncreas, ovario, vejiga, pulmón y en el carcinoma escamoso de la cabeza y el cuello⁶

Los métodos de identificación de las células madre tumorales (CMT) en las neoplasias sólidas son los mismos que los que se emplean en diferenciar en los tejidos normales las células madre (CM) de su progenie diferenciada. Estos métodos incluyen la expresión de determinados antígenos de superficie, la actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH), el flujo de colorantes vitales por transportadores multidroga [Hoechst 33342] y la propiedad de estas células para agruparse formando esferas en cultivos celulares⁵. De todos estos métodos, el más empleado es la identificación de la expresión de determinados antígenos de superficie. Actualmente, sin embargo, hay poco consenso acerca de la utilidad del empleo de marcadores de superficie celular para la identificación de células con características de célula madre en muchos tejidos. En cáncer de pulmón se han estudiado con ese propósito el CD 133 y la nestina⁸, sin que su coexpresión tenga ningún impacto en la supervivencia ni en el tiempo libre de enfermedad.

Debido a la falta de consenso acerca de la utilidad de los marcadores de superficie celular para identificar células con propiedades de CM, sería deseable el empleo de marcadores basados en las propiedades intrínsecas de las CM. Independientemente de su tejido de origen, las CM comparten la expresión de actividad aldehído deshidrogenada⁸

La aldehído deshidrogenasa es una enzima detoxificadora, de la que hasta el momento se han descrito 19 isoformas⁹, responsable de la oxidación intracelular de aldehídos a ácidos carboxílicos. La ALDH1 (ALDH1A1) puede tener un papel en la diferenciación temprana o inicial de las células madre, a través de la oxidación del retinol en ácido retinoico. El ensayo de ALDEFLUOR® (ALDEFLUOR® assay) permite medir la actividad ALDH y fue desarrollado originalmente por Storms RW et al para detectar la actividad de la ALDH en

tejidos hematopoyéticos¹⁰. El reactivo ALDEFLUOR se sabe que actúa como sustrato para ALDH1A1. Se considera que la actividad de la ALDH1A1 puede ser un marcador común para ambos, células madre normal y cancerosas⁸. Más recientemente el ensayo de ALDEFLUOR® se ha aplicado con éxito en la detección de CM normales y tumorales en otros tejidos como la mama, carcinomas de mama, pulmón, vejiga, próstata, páncreas, ovario y en los carcinomas de cabeza y cuello^{3 11}. Algunos autores consideran que estos resultados podrían convertir a esta técnica en un método generalizado para la caracterización, identificación y aislamiento de CM de diversos orígenes⁸.

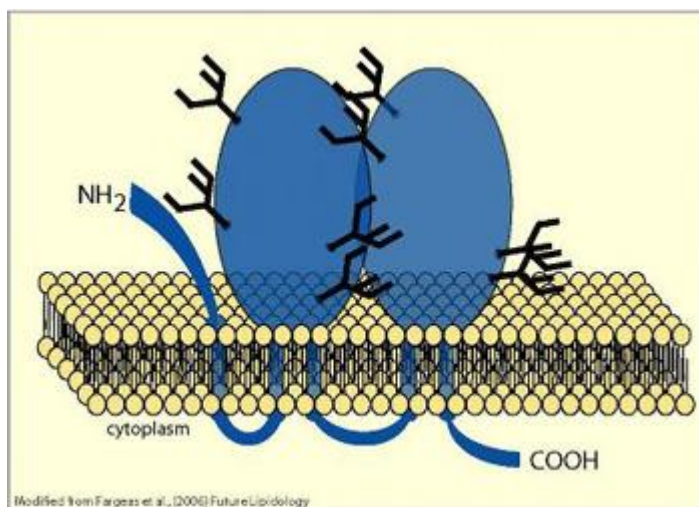
Es de gran importancia reseñar que la presencia de ALDH1A1 puede demostrarse también mediante técnicas de inmunohistoquímica, western blotting y fluorescencia⁹. Existe una clara correlación entre la inmunotinción in situ y el ensayo de actividad de ALDH1A1 con ALDEFLUOR®⁶. Se puede emplear un anticuerpo específico frente a ALDH1A1 para detectar las células madre tumorales en muestras clínicas incluidas en parafina¹², lo que facilita su aplicación clínica^{6 12}.

En esta línea, grupos de investigadores independientes emplean la expresión de ALDH1A1 como un marcador pronóstico en distintos tipos de cánceres epiteliales: mama¹³, pulmón¹⁴, ovario¹⁵, páncreas¹⁶, vejiga¹⁷, carcinoma inflamatorio de mama¹⁸ y próstata¹⁹. Estos grupos demuestran que en los tumores de mama^{13,18}, pulmón¹⁴, páncreas¹⁶, vejiga¹⁷, próstata¹⁹ y serosos de ovario⁶, la expresión de ALDH1A1 en un gran número de células del tumor se asocia con menor supervivencia. Sin embargo, en otra serie de tumores de ovario, de tipo endometriode, la expresión de ALDH1A1 se asoció con un pronóstico favorable¹⁵.

Es precisa la búsqueda de otros marcadores potenciales de células con características de CM. La identificación de células con características de CM mediante un único marcador puede sea insuficiente para la identificación de una población pura. En esta búsqueda se estudia el papel del CD133 como nuevo marcador de CMT con una potencial aplicabilidad clínico-pronóstica.

CD133, también denominada prominina-1, es una glucoproteína de membrana, formada por cinco dominios transmembrana y dos bucles glicosilados extracelulares (Fig 1). El gen de CD133 está localizado en el cromosoma 4p15, una región que contiene genes relacionados con la homeostasis de la maduración celular, la tumorigénesis y la progresión del cáncer²⁰. Además, está descrita la posible participación de CD133 en la transición epitelio-mesénquima, un evento biológico clave en el proceso de invasión tumoral²¹. Numerosos estudios han puesto de manifiesto que las células CD133+ poseen fenotipo de CMT, favoreciendo la autorrenovación y la capacidad tumorigénica. Sin embargo, existe mucha controversia en la literatura entre la correlación de la expresión de CD133 y los parámetros clinicopatológicos, así como su papel como factor pronóstico en el cáncer de pulmón no célula pequeña.²²

Fig 1: Estructura química de CD133



(<http://flipper.diff.org/app/pathways/info/2949>)

CD133 se expresa con frecuencia en células madre adultas, donde se cree que actúa manteniendo las propiedades de célula madre, inhibiendo la diferenciación celular. La función exacta de CD133 es aún desconocida; algunos autores sugieren que su posición en la membrana tiene relación con la organización dinámica de la estructura celular, lo que favorece la determinación de la polaridad celular, la migración y la interacción con otras células vecinas²³.

Debido a la gran heterogeneidad en los resultados publicados acerca de la determinación de CMT, creemos que debe usarse más de un marcador para una mejor caracterización de las mismas. Por ello, creemos interesante la combinación de ALDH1 y CD133 como marcadores de CMT

Hasta la fecha no hay ningún trabajo, del que tengamos conocimiento, en el que se haya utilizado tejido humano primario para el estudio de la combinación de ALDH1 y CD133 para la identificación de CMT en el cáncer de pulmón estadio I, por lo que sería interesante desarrollar este campo y tratar de

averiguar su impacto en la supervivencia de los pacientes, así como un posible beneficio de la quimioterapia adyuvante.

3. OBJETIVOS

1. Identificar CM mediante la expresión inmunohistoquímica de ALDH1 y CD133
2. Cuantificar y valorar los patrones de expresión de ALDH1 y CD133
3. Analizar los patrones de expresión con las distintas variables clinicopatológicas (sexo, edad, hábito tabáquico, tipo histológico, grado de diferenciación, tamaño tumoral, invasión de pleura visceral, recidiva y desarrollo de segundos tumores) y con la supervivencia (libre de enfermedad y global)
4. Analizar la relación entre expresión de ALDH1 y CD133 y mutaciones en EGFR

4. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL:

Se realizó un estudio de tipo cohorte histórica en 118 pacientes intervenidos quirúrgicamente de un carcinoma no células pequeñas de pulmón estadio I entre el año 2004 y 2009 en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid. El tiempo mínimo de seguimiento fue de 24 meses o hasta el fallecimiento por la enfermedad o por otra causa.

De los 118 pacientes seleccionados, 78 fueron incluidos definitivamente en el análisis de nuestro estudio; el resto fueron excluidos por diversas causas:

- 13 pacientes por haber recibido tratamiento neo/adyuvante con quimioterapia.
- 9 pacientes por ser diagnosticados de histologías distintas a las de carcinoma escamoso y adenocarcinoma.
- 13 pacientes por pérdida del seguimiento.
- 5 pacientes por muerte en el postoperatorio inmediato debido a complicaciones de la cirugía.

Los datos clínicos e histológicos se obtuvieron de los archivos de los Servicios de Anatomía Patológica, Cirugía Torácica y Oncología Médica del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid.

Se incluyeron las siguientes variables clínico-patológicas: edad en el momento del diagnóstico, sexo, histología, grado de diferenciación, tamaño tumoral, invasión de pleura visceral, recidiva, desarrollo de segundos tumores y fecha de la muerte.

MÉTODO HISTOLÓGICO

El patólogo elige las secciones representativas del tumor y las corta en secciones de 1 x 1 x 0,5 cm, se introducen en un casete con formol al 10% y posteriormente en un procesador automático de tejidos. El procesado estándar para el estudio histopatológico es la inclusión del tejido en parafina. Su objetivo es sustituir el agua de los tejidos por parafina líquida caliente que al enfriarse adquirirá una consistencia adecuada para el corte. Como la parafina es insoluble en agua es preciso eliminar previamente esta última del tejido, sustituyéndola inicialmente por alcohol (deshidratación) y posteriormente por tolueno o xileno (aclaramiento) que al ser solubles en parafina pueden ser sustituidos finalmente por ella. Así se obtiene un tejido embebido en parafina que será introducido en moldes con parafina líquida. Al enfriarse los moldes obtendremos un "bloque de parafina" a partir del cual pueden obtenerse las secciones, almacenar y manipular. A partir de los bloques se obtienen cortes muy finos, de 3-4 micras de espesor. El corte se realiza mediante microtomos. Una vez obtenidos los cortes se extenderán en un baño de agua caliente y fijarán sobre un portaobjetos. Los cortes obtenidos son tratados mediante un proceso de "desparafinado" para eliminar la parafina y volver a sustituirla por agua, siendo posteriormente teñidos. Las tinciones de Hematoxilina-Eosina se han realizado en un teñidor automático que al final las tapa con un cubreobjetos.

MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Se analizaron las piezas operatorias obtenidas del archivo del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Puerta de Hierro. Todas las muestras estaban fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina. Para el propósito del estudio se utilizaron las muestras más representativas de la lesión tumoral, en general en la zona de avance tumoral. Sobre estos bloques se realizó el estudio inmunohistoquímico del grado y los patrones de expresión de ALDH1A1 y CD133.

Las muestras de tejido, se cortaron con un micrótopo rotatorio a 3 µm de espesor. Los cortes incluidos en parafina fueron inicialmente desparafinados en xylol, rehidratándose en alcoholes de gradación decreciente y lavándose

posteriormente en PBS (fosfato buffer salino). A continuación se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena y se procedió a la recuperación antigénica en olla a presión durante 2 minutos en EDTA a pH 8. Luego se procedió a la incubación durante 1 hora con el anticuerpo policlonal específico (ALDH1A1 (Abcam) dilución 1/100 y CD113 (Biorbyt), dilución 1/50). El complejo Envision+peroxidasa se empleó como método de visualización. El producto de la reacción antígeno-anticuerpo se reveló con una solución de diaminobencidina y H2O2. Posteriormente, los núcleos se tiñeron con hematoxilina de Harris (15 segundos) y las muestras se deshidrataron en alcoholes de concentraciones crecientes para finalmente montarlas en un medio permanente (Eukitt) (O. Kindler GMBH&Co.;Freiburg, Alemania).

Las muestras teñidas con los anticuerpos fueron evaluadas al microscopio como positivas o negativas mediante un análisis visual subjetivo por dos patólogos expertos (CG y CS). ALDH1 y CD133 se consideraron positivas cuando más del 1% de las células tumorales expresaban tinción. De control externo se utilizó hígado fetal en el caso de ALDH1 y médula ósea en el caso de CD133.

ANÁLISIS DE MUTACIONES EGFR

Se realizó una PCR en tiempo real según el método Scorpions-ARMs. Primeramente se obtuvo el ADN a partir de muestras de biopsias fijadas en formol e incluidas en parafina. Se seleccionó un área representativa del tumor, evitando áreas de necrosis o mal preservadas. Este área se diseccionó del bloque de parafina realizando un surco con un punzón y tomando cortes sucesivos de 5µm, que fueron depositados en un tubo Eppendorf. A continuación se produjo la desparafinización de la muestra tratando con un 1ml de xilol durante una hora. El xilol se eliminó con una pipeta tras la centrifugación del tejido a 11000g, seguido de dos lavados de etanol absoluto. Los restos de etanol se eliminaron por evaporación a 37°C. Para obtener el DNA se utilizó el sistema NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel): el tejido se digirió en el tampón de lisis proporcionado, en presencia de proteinasa K. Una vez lisado, se añadió etanol con el fin de precipitar el ADN y se transfirió a una columna que contiene una membrana de sílica donde quedó unido. Tras dos pasos de lavado y uno de secado de la membrana, se añadieron 100ul de solución para elución y

recuperación del ADN. Para cuantificar el ADN se utilizó un equipo de espectrometría (Picodrop). La concentración del ADN en ng/ul se calculó a partir de la densidad óptica (OD) a 260nm. La pureza del mismo se estimó mediante el ratio OD260/OD280. Por último se realiza la PCR en tiempo real con el sistema comercial TheraScreen EGFR RGQ PCR Kit (Qiagen) que utiliza la técnica Scorpions-ARMS, añadiendo un control positivo y otro negativo con H₂O. Se utilizaron primers para detectar las siguientes mutaciones: T790M, deleciones en exón 19, L858R, L861Q, G719X, S768I e inserciones en exón 20. El equipo utilizado para ello fue RotorGene Q (Quiagen).

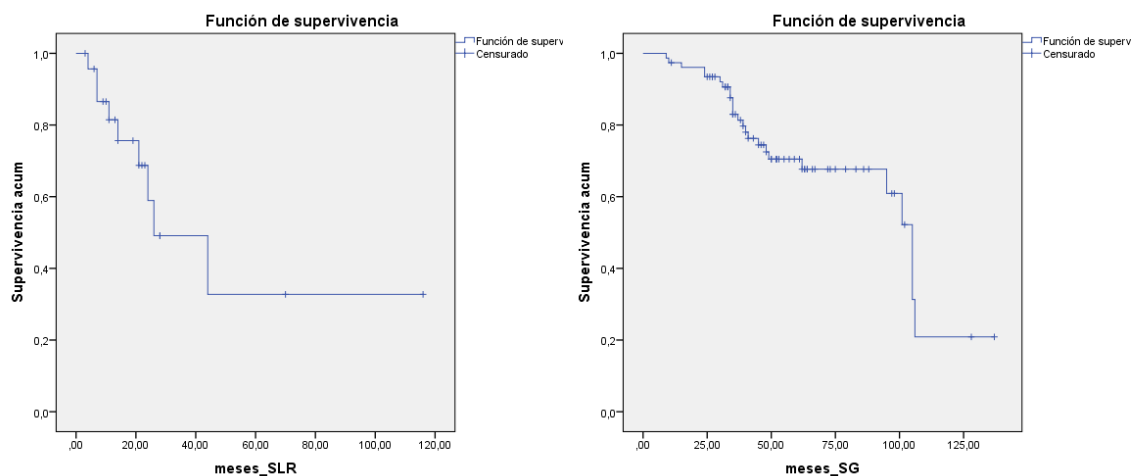
MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El estudio descriptivo de los datos consistió en el cálculo de la media y desviación estándar para variables cuantitativas y del cálculo de la frecuencia relativa para las variables cualitativas. La asociación entre variables cualitativas se estudió mediante el test de la Chi-cuadrado de Pearson o el test exacto de Fisher, cuando fuera aplicable. Para comparar las medias de las variables cuantitativas entre dos o más grupos, se utilizarán respectivamente la t de Student o el análisis de la varianza. El análisis del tiempo de la supervivencia global y de la supervivencia libre de enfermedad se realizaron mediante el método de Kaplan-Meier y la comparación entre los distintos subgrupos se efectuó mediante el test de long-rank. Para el análisis multivariante se empleó el test de la regresión de Cox. En todos los casos se consideraron como estadísticamente significativos aquellos p valores menores de 0.05. Todos los análisis se realizaron la ayuda del programa SPSS versión 21.

5. RESULTADOS

De los 77 pacientes analizados, 63 eran varones (82%) y 14 mujeres (18%), con una edad media de 64 años de manera global: 65 años los varones y 59 años las mujeres. La mediana de supervivencia libre de recaída fue de 26 meses (IC95% 4,9 - 47,1 meses), y la supervivencia global de nuestra serie tuvo una mediana de 105 meses (IC95% 96,27-113,72 meses). (Figura 2). La supervivencia a los 3 y 5 años fue del 83% y 68% respectivamente.

Figura 2: Curvas de SLR y SG en el global de nuestra muestra



En cuanto al hábito tabáquico, un 51% de los pacientes eran ex – fumadores en el momento del diagnóstico, un 35% fumadores y un 13% nunca habían sido fumadores. Si analizamos el hábito tabáquico por sexo, observamos que en el grupo de mujeres hay un mayor porcentaje de fumadores que en el grupo de varones, y que sólo 1% de los cánceres de pulmón en mujeres se da en no fumadores. (Tabla 1)

Tabla 1: Relación entre sexo y hábito tabáquico

Sexo	Fumadores	Exfumadores	Nunca fumadores
Hombres	30 %	55 %	15 %
Mujeres	59 %	40 %	1 %

5.1. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE TUMORALES MEDIANTE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE ALDH1 Y CD133

Cuando analizamos la variable ALDH1 en el conjunto de los tumores, observamos un porcentaje similar entre positivos y negativos (48% vs 52%). No ocurre así cuando analizamos dicha variable en los subtipos histológicos principales, siendo más frecuentemente positiva en el subtipo carcinoma escamoso (Tabla 2; figuras 3-6)

De los 77 tumores analizados, sólo 7 fueron positivos para CD133 (8.9%). Cuando analizamos la expresión por tipos histológicos, observamos que el 100% de los carcinomas escamosos fueron negativos para CD 133, y el 17.8% de los adenocarcinomas resultaron positivos (Tabla 2; figuras 7-8)

Tabla 2: Relación entre la expresión de ALDH1 y CD133 y los subtipos histológicos:

		ALDH1		CD133		TOTAL
		NEG	POS	NEG	POS	
Tipo histológico	Carcinoma escamoso	31.6% (12)	68.4% (26)	100% (38)	0% (0)	38
	Adenocarcinoma	64.1% (25)	35.9% (14)	84.2% (32)	15.8% (7)	39
Total		37	40	70	7	77
		p=0.004		p=0.006		

Figura 3: ALDH1+ en un adenocarcinoma

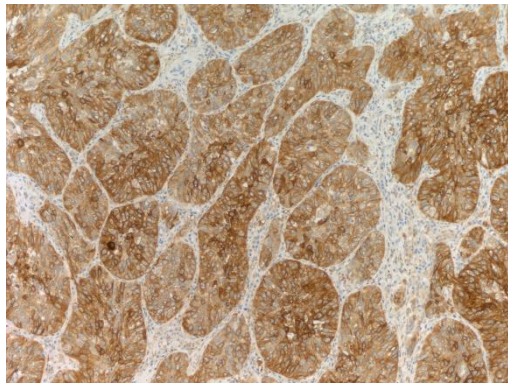


Figura 4: ALDH+ en un carcinoma escamoso

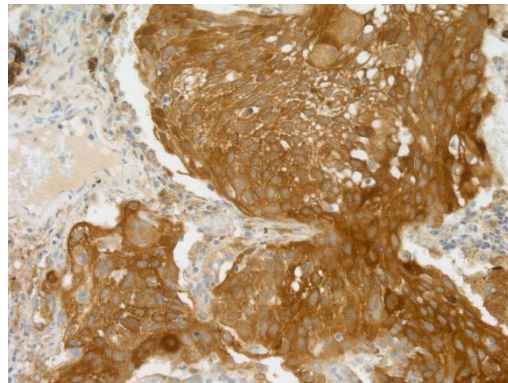


Figura 5: ALDH1- en un adenocarcinoma

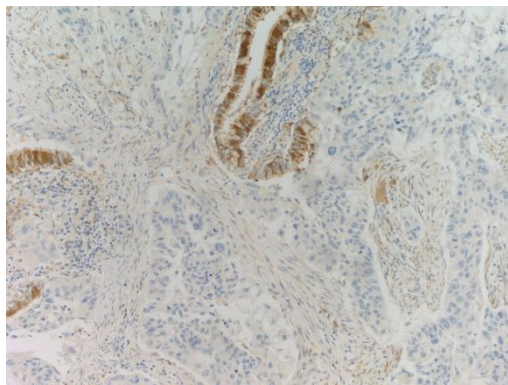


Figura 6: ALDH- en un carcinoma escamoso

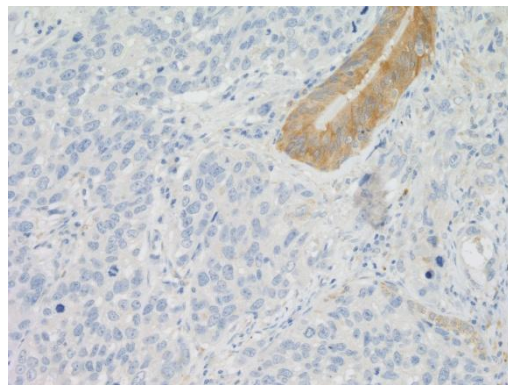


Figura 7: CD133+ en un adenocarcinoma

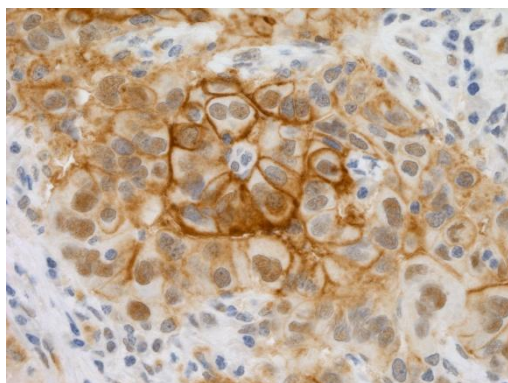
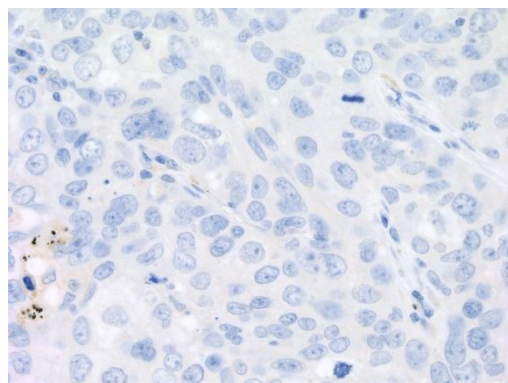


Figura 8: CD133- en un carcinoma escamoso



Cuando analizamos los dos marcadores de CMT entre sí, ALDH1 y CD133, encontramos una relación inversa entre ellos en los adenocarcinomas, es decir, todos los tumores con CD133 positivos eran ALDH1 negativos (Tabla 3).

Tabla 3: Relación entre la expresión de CD133 y ALDH1:

		ALDH1		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
CD133	Negativo	18	14	32
	Positivo	7	0	7
Total		25	14	79

p=0.031

Conclusión: No encontramos co-expresión de ALDH1 y CD133 en ninguno de nuestros pacientes. Por ello, no hemos conseguido identificar CMT en NSCLC estadio I utilizando como marcadores ALDH1 y CD133.

5.2. CUANTIFICACIÓN Y VALORACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE ALDH1 Y CD133

Observamos dos patrones de expresión distintos de ALDH1; la gran mayoría de los tumores presentaban una tinción granular y citoplasmática pero encontramos 3 casos con tinción nuclear que, brevemente, se distribuían en un caso de carcinoma escamoso, otro de adenocarcinoma y un tercero un mucoepidermoide (Figuras 9-11).

Centrándonos en los tumores con expresión citoplasmática, observamos tres patrones predominantes (Tabla 4):

- Expresión en gradiente: caracterizados por grupos de células de mayor intensidad en el centro del grupo de células positivas que en la periferia (Figura 12).
- Expresión difusa: cuando más del 75% de las células presentaban positividad para ALDH1 (Figura 13).
- Otros: bien en grupos focales o en forma de células aisladas repartidas por el tumor (Figura 14).

Tabla 4: Expresión de ALDH1 en el global de los tumores estudiados

Patrones expresión ALDH1	Frecuencia	Porcentaje
Negativo	37	48.1%
Gradiente	20	26%
Difusa	6	7.8%
Nuclear	3	3.9%
Otras	11	14.2%

A pesar de haber diferencias globales en cuanto a la expresión, no existe ningún patrón de expresión que discrimine los dos grandes grupos histológicos. (Tabla 5 y figura 15). Sin embargo, el patrón en gradiente fue el más frecuentemente observado en ambos grupos.

Figura 9: ALDH1+ nuclear en adenocarcinoma

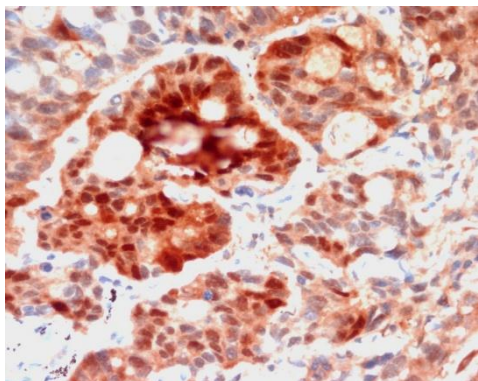


Figura 10: ALDH1+ nuclear en carcinoma escamoso

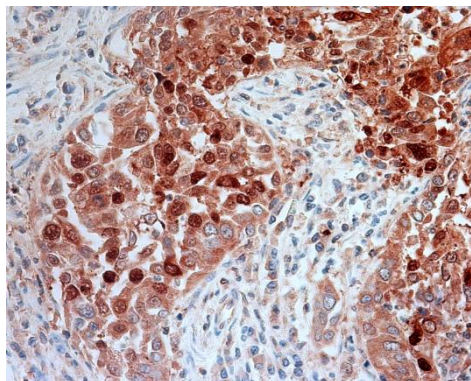


Figura 11: ALDH+ nuclear en mucoepidermoide

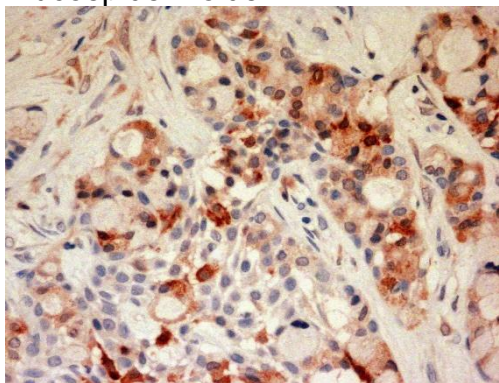


Figura 12: ALDH+ en gradiente

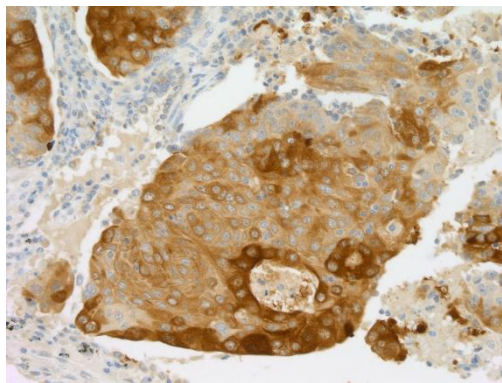


Figura 13: ALDH+ difuso

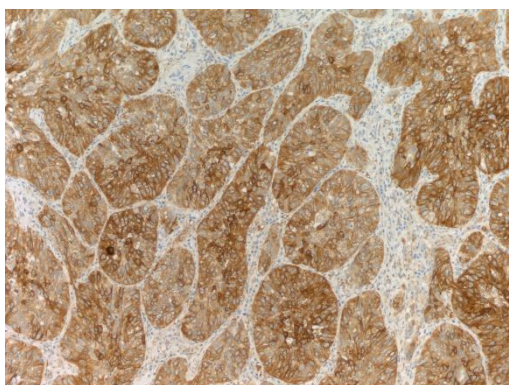


Figura 14: Otras formas de expresión de ALDH citoplasmática

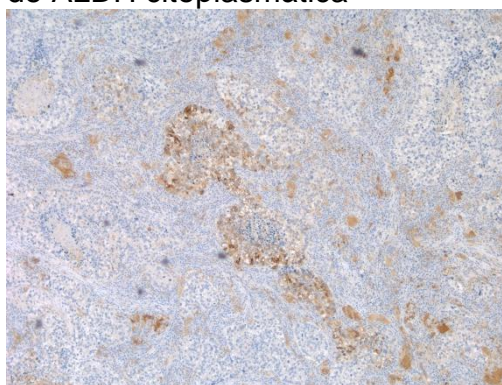
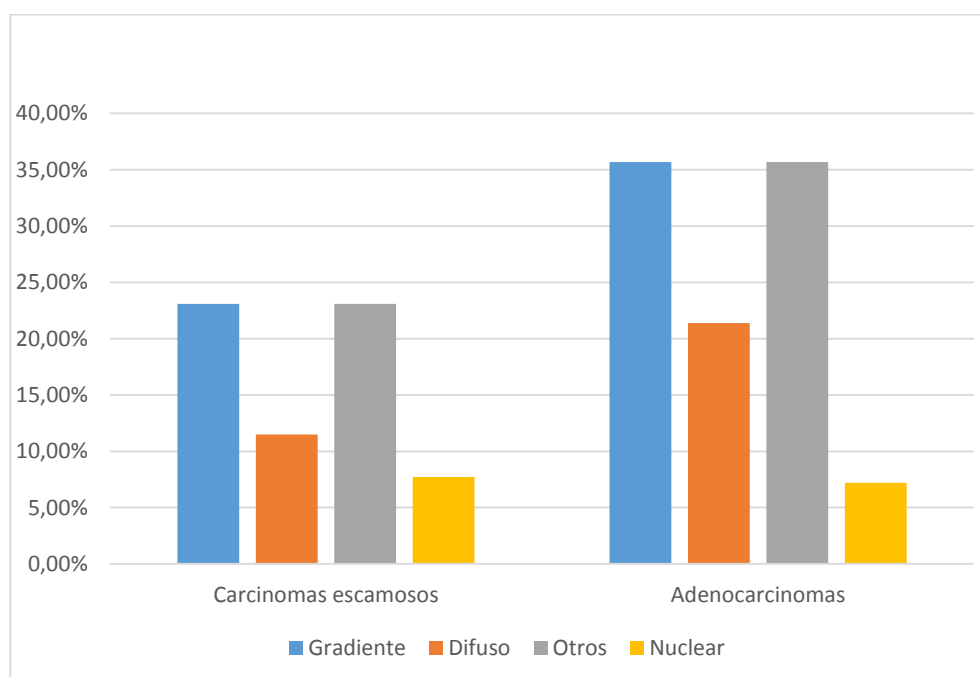


Tabla 5: Expresión citoplasmática de ALDH1 según tipo histológico:

	ALDH1				TOTAL
	Gradiente	Difuso	Nuclear	Otros	
Carcinoma escamoso	23.1% (6)	11.5% (3)	7.7% (2)	23.1% (6)	26
Adenocarcinoma	35.7% (5)	21.4% (3)	7.2% (1)	35.7% (5)	14
Total	27.5% (11)	15% (6)	7.5% (3)	27.5% (11)	40

p=0.57

Figura 15: Distribución de la expresión citoplasmática de ALDH por subtipos histológicos



El marcador CD133 resultó tener expresión de membrana y fue difusa en todos los casos.

Cuando analizamos los dos marcadores de CMT entre sí, ALDH1 y CD133, encontramos una relación inversa entre ellos en los adenocarcinomas, es decir, todos los tumores con CD133 positivos eran ALDH1 negativos (Tabla 6)

Tabla 6: Relación entre la expresión de CD133 y ALDH1:

		ALDH1		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
CD133	Negativo	18	14	32
	Positivo	7	0	7
Total		25	14	39

p=0.031

Conclusión: ALDH1 en NSCLC estadio I se expresa tanto en el núcleo como en el citoplasma; en el citoplasma existen varios patrones de expresión, entre ellos, en gradiente y difuso.

CD133 tiene expresión de membrana de forma difusa.

No existe co-expresión entre los dos marcadores.

5.3. ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN CON LAS DISTINTAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS (SEXO, EDAD, HÁBITO TABÁQUICO, TIPO HISTOLÓGICO, GRADO DE DIFERENCIACIÓN, TAMAÑO TUMORAL, INVASIÓN DE PLEURA VISCERAL, RECURRENCIA Y DESARROLLO DE SEGUNDOS TUMORES) Y CON LA SUPERVIVENCIA (LIBRE DE ENFERMEDAD Y GLOBAL)

De los 77 pacientes estudiados, 38 presentaban histología de carcinoma escamoso y 39 de adenocarcinoma. El 100% de los pacientes con carcinomas escamosos fueron varones; el 64% de los adenocarcinomas fueron varones y un 36% mujeres. Los tumores poco diferenciados fueron los menos frecuentes en ambos grupos (25% y 19% respectivamente). En cuanto al tamaño, los carcinomas escamosos tienen un tamaño mayor que los adenocarcinomas (3.2cm vs 2.5cm; $p=0.024$); además, los carcinomas escamosos son con más frecuencia superiores a 4 centímetros ($p=0.042$). En el análisis de la invasión de la pleura visceral, no encontramos diferencias entre los carcinomas escamosos y los adenocarcinomas. El 77.8% de los carcinomas escamosos y el 76.9% de los adenocarcinomas no presentan invasión de la pleura visceral al diagnóstico (Tabla 7)

Tabla 7: Características histológicas de los tumores estudiados

		CARCINOMAS ESCAMOSOS	ADENOCARCINOMAS
GRADO DE DIFERENCIACIÓN	BIEN	37 %	42 %
	MODERADO	37 %	39 %
	POCO	26 %	19 %
TAMAÑO	<4 cm	78 %	95 %
	>4 cm	22 %	5 %
INVASIÓN PLEURA VISCERAL	SI	22 %	23 %
	NO	78 %	77 %

Comenzamos analizando la expresión de ALDH1 con el resto de variables clínico-patológicas; existe un predominio de la expresión de ALDH1 entre los varones (Tabla 8). No hubo diferencias entre la edad media al diagnóstico, siendo ésta de 63 años en los casos ALDH+ y de 66 años en los casos ALDH- (Tabla 9).

Tabla 8: Relación entre la expresión de ALDH1 y sexo:

		ALDH1		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
Sexo	Varón	26	37	63
	Mujer	10	4	14
Total		36	41	77

p=0.045

Tabla 9: Relación entre la expresión de ALDH1 y edad media al diagnóstico:

	N	Media (años)	Desviación típica	Error típico	IC para la media 95%	Mínimo	Máximo
ALDH-	37	62.91	11.91	1.96	58.95-66.89	27	85
ALDH+	41	65.56	11.38	1.77	61.97-69.15	31	79
Total	78	64.31	11.64	1.32	61.69-66.93	27	85

p=0.3

Analizamos la relación entre el hábito tabáquico y la expresión de ALDH1 y no encontramos diferencias entre ellos; tampoco entre el grado de diferenciación y ALDH1 ni entre la invasión de la pleura visceral y ALDH1, ni en los tumores escamosos ni en los adenocarcinomas (Tabla 10 y 11)

Sin embargo, sí encontramos diferencias entre el tamaño y la expresión de ALDH1 en el subgrupo de escamosos, siendo tumores más pequeños los ALDH1+. (Tabla 12).

Tabla 10: Relación entre el hábito tabáquico, el grado de diferenciación, la invasión de la pleura visceral y ALDH1 en el grupo de adenocarcinomas

		ALDH1		p
		-	+	
Hábito tabáquico	No fumador	6	1	0.34
	Fumador	8	7	
	Exfumador	11	6	
Grado de diferenciación	Poco diferenciado	5	2	0.54
	Moderadamente diferenc.	7	7	
	Bien diferenciado	10	5	
Invasión pleura visceral	Sí	5	4	0.41
	No	20	1	

Tabla 11: Relación entre el hábito tabáquico, el grado de diferenciación, la invasión de la pleura visceral y ALDH1 en el grupo de carcinomas escamosos

		ALDH1		p
		-	+	
Hábito tabáquico	No fumador	1	2	0.65
	Fumador	2	9	
	Exfumador	7	14	
Grado de diferenciación	Poco diferenciado	1	8	0.51
	Moderadamente diferenc.	4	9	
	Bien diferenciado	4	9	
Invasión pleura visceral	Sí	1	7	0.23
	No	9	19	

Tabla 12: Relación entre el tamaño tumoral y la expresión de ALDH1 en carcinomas escamosos y adenocarcinomas:

Carcinomas escamosos:

	N	Media (cm)	Desviación típica	Error típico	IC para la media 95%	Mínimo	Máximo
ALDH-	10	3.92	1.61	0.51	2.77-5.07	1	6.5
ALDH+	26	2.81	1.11	0.22	2.35-3.25	1.2	5.5
Total	36	3.11	1.34	0.22	2.66-3.57	1	6.5

p=0.024

Adenocarcinomas

	N	Media (cm)	Desviación típica	Error típico	IC para la media 95%	Mínimo	Máximo
ALDH-	25	2.6	0.94	0.19	2.21-2.98	1.20	4.10
ALDH+	14	2.3	0.76	0.20	1.89-2.77	0.80	3.50
Total	39	2.5	0.88	0.14	2.22-2.79	0.80	4.10

p=0.37

En cuanto a la expresión de CD133 no encontramos relación con el sexo, edad media al diagnóstico, tamaño tumoral, grado de diferenciación ni invasión de pleura visceral (Tablas 13,14 y 15)

Tabla 13: Relación entre el sexo, el grado de diferenciación, la invasión de la pleura visceral y CD133

		CD133		p
		-	+	
Sexo	Varón	22	3	0.19
	Mujer	10	4	
Grado de diferenciación	Poco diferenciado	6	1	0.92
	Moderadamente diferenc.	11	3	
	Bien diferenciado	12	3	
Invasión pleura visceral	Sí	8	1	0.48
	No	24	6	

Tabla 14: Relación entre la expresión de CD133 y la edad media al diagnóstico

	N	Media (años)	Desviación típica	Error típico	IC para la media 95%	Mínimo	Máximo
CD133-	71	63.83	11.76	1.39	61.05-66.61	27	80
CD133+	7	69.14	9.75	3.69	60.12-78.16	58	85
Total	78	64.31	11.63	1.32	61.68-66.93	27	85

p=0.3

Tabla 15: Relación entre la expresión de CD133 y el tamaño tumoral

	N	Media (cm)	Desviación típica	Error típico	IC para la media 95%
CD133-	32	2.45	0.81	0.14	2.15-2.73
CD133+	7	2.77	1.19	0.45	1.66-3.87
Total	39	2.51	0.88	0.14	2.22-2.79

p=0.47

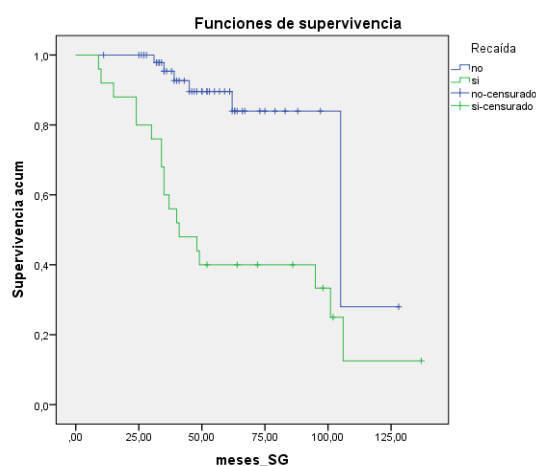
En cuanto a las recaídas, los pacientes que recayeron tuvieron una mediana de supervivencia global de 41 meses frente a los que no recayeron, que en cuyo caso fue de 105 meses (Tabla 16; figura 16)

Tabla 16: Diferencia en supervivencia global entre los pacientes con/sin recaída:

RECAÍDA	MEDIA			MEDIANA		
	ESTIMACION	ERROR TÍPICO	IC 95%	ESTIMACION	ERROR TÍPICO	IC 95%
NO	102.06	6.91	88.52-111.6	105.00	17.65	70.4-139.6
SI	63.72	8.89	46.23-81.16	41.00	9.16	23.1-58.9
GLOBAL	88.52	6.23	76.31-100.7	105.00	4.45	96.3-113.7

P<0.0001

Figura 16: Curva de SG según recaída



p<0.0001

Por otro lado, la presencia o no de ALDH1 no se relaciona con el número de recaídas ni en los pacientes con carcinomas escamosos ni en los adenocarcinomas (Tabla 17). En el caso de CD133, ninguno de los siete pacientes CD133 positivos sufrieron recaídas (Tabla 18). Esta disminución en el número de recaídas, sin embargo, no influye en el aumento de supervivencia global (Tabla 19; figura 17); es importante destacar que el grupo de pacientes CD133+ no han alcanzado la mediana de supervivencia global hasta el momento.

Tabla 17: Relación entre expresión de ALDH1 y recaídas:

Carcinomas escamosos:

RECAÍDA	ALDH1		TOTAL
	NEGATIVO	POSITIVO	
NO	7	19	26
SI	5	6	11
TOTAL	12	25	37

p=0.23

Adenocarcinomas:

RECAÍDA	ALDH1		TOTAL
	NEGATIVO	POSITIVO	
NO	17	7	24
SI	7	7	14
TOTAL	24	14	38

p=0.17

Tabla 18: Relación entre el número de recaídas y la expresión CD133:

RECAÍDA	CD133		TOTAL
	NEGATIVO	POSITIVO	
NO	19	7	26
SI	13	0	13
TOTAL	32	7	39

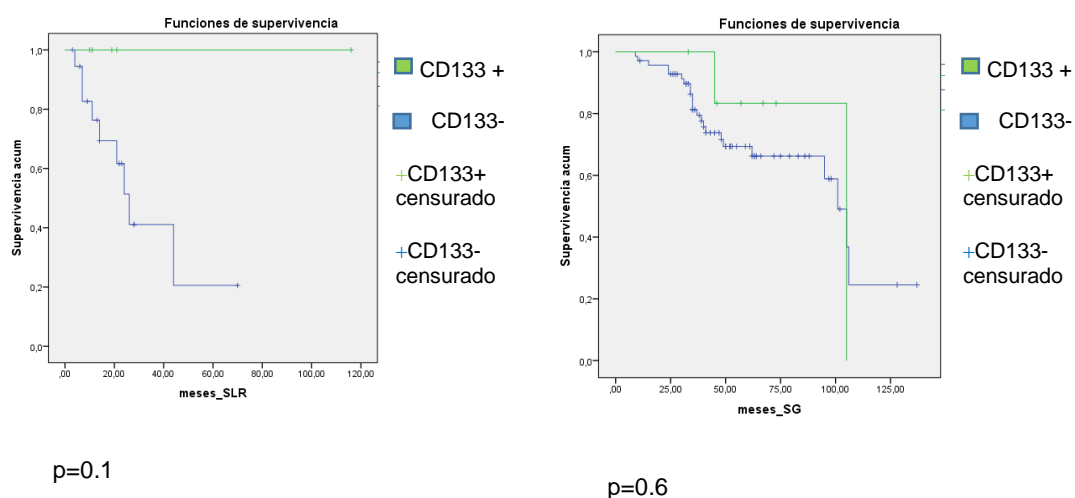
p=0.043

Tabla 19: Medianas de supervivencia según expresión de CD133

CD133	MEDIA			MEDIANA		
	ESTIMACION	ERROR TÍPICO	IC 95%	ESTIMACION	ERROR TÍPICO	IC 95%
Negativo	88.44	6.87	74.9-101.9	101.00	5.32	90.6-111.4
Positivo	95.00	12.91	69.7-120.3	105.00	0.00	-
GLOBAL	88.52	6.23	76.3-100.7	105.00	4.45	96.3-113.7

p= 0.594

Figura 17: Curvas de SLR y SG en función de expresión de CD133



En el análisis de supervivencia, no encontramos diferencias en la supervivencia libre de recaída ni en la supervivencia global con el sexo, hábito tabáquico, tipo histológico, con la invasión de pleura visceral así como con el grado de diferenciación (Tablas 20 y 21; figuras 18-22). Hay que destacar de nuevo que hay grupos en los que todavía no se ha alcanzado la mediana, como ocurre en el análisis del hábito tabáquico y del grado de diferenciación.

Tabla 20: Análisis de supervivencia libre de recaída en las distintas variables clínico-patológicas

Variables		Mediana (meses)	Intervalo de confianza 95%	P
Sexo	Hombres	26	-	0,83
	Mujeres	44	11,57 – 76,43	
Tabaco	Fumadores	24	5,7-42-28	0,28
	No fumadores			
	Ex-fumadores			
Histología	Carc. Escamosos	26	0,0 – 53,23	0,74
	Adenocarcinomas	24	2,6 - 45,35	
Invasión Pleura visc.	Sí	22	0,0 – 50,51	0,16
	No	44	8,96 – 79,04	
Grado	Pobre diferenciado	24	-	0,81
	Moderad. dif.	44	-	
	Bien diferenciado	-		

Tabla 21: Análisis de supervivencia global en las distintas variables clínico-patológicas

Variables		Mediana (meses)	Intervalo de confianza 95%	P
Sexo	Hombres	101	91,21 – 110,79	0,41
	Mujeres	105	24,75 – 185,25	
Tabaco	Fumadores	-	-	0,73
	No fumadores	105		
	Ex-fumadores	101		
Tipo histológico	Carc. Escamosos	105	86,84 – 123,15	0,73
	Adenocarcinomas	101	13,30 – 188,71	
Invasión Pleura visc.	Sí	105	23,41 – 186,59	0,79
	No	101	88,92 – 113,08	
Grado	Pobre diferenciado	105	-	0,10
	Moderad. dif.	101	53,85 – 148,54	
	Bien diferenciado	95	29,30 – 160,70	

Figura 18: Curvas de SLR y SG según el sexo:

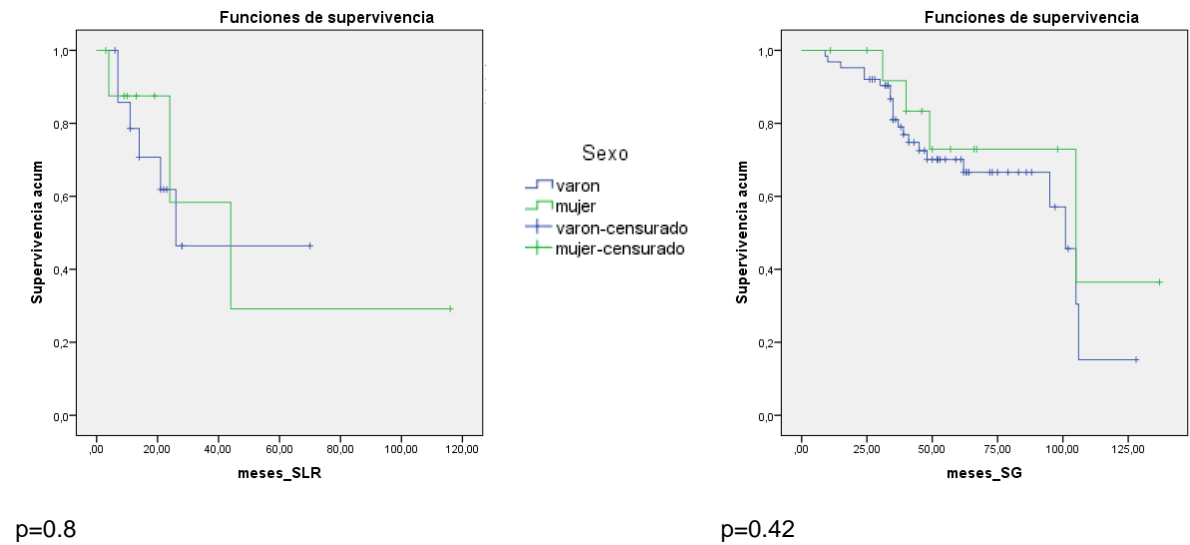


Figura 19: Curvas de SLR y SG según hábito tabáquico:

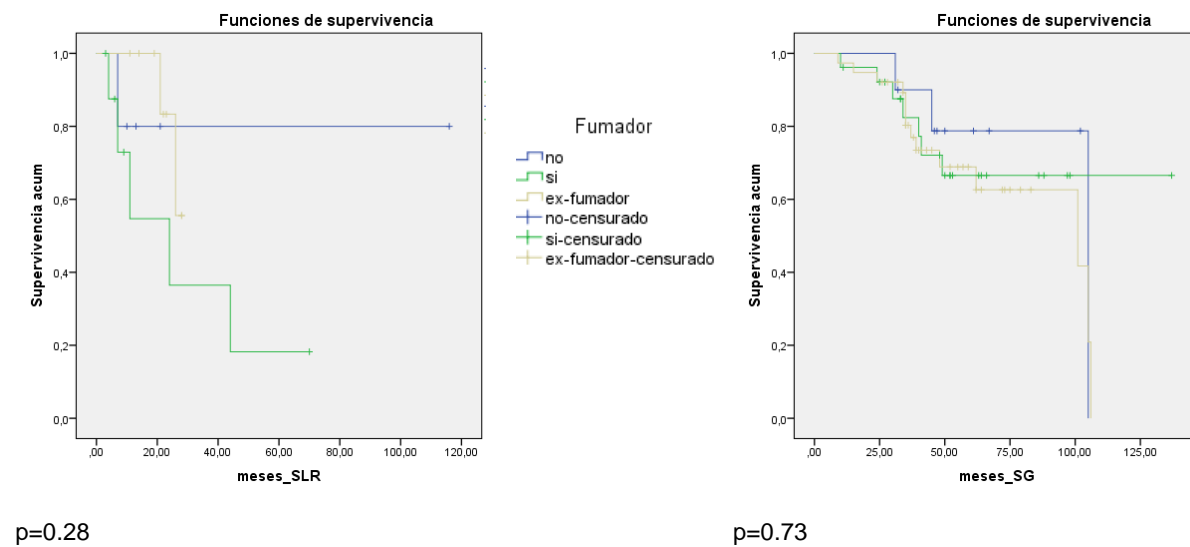


Figura 20: Curvas de SLR y SG según tipo histológico:

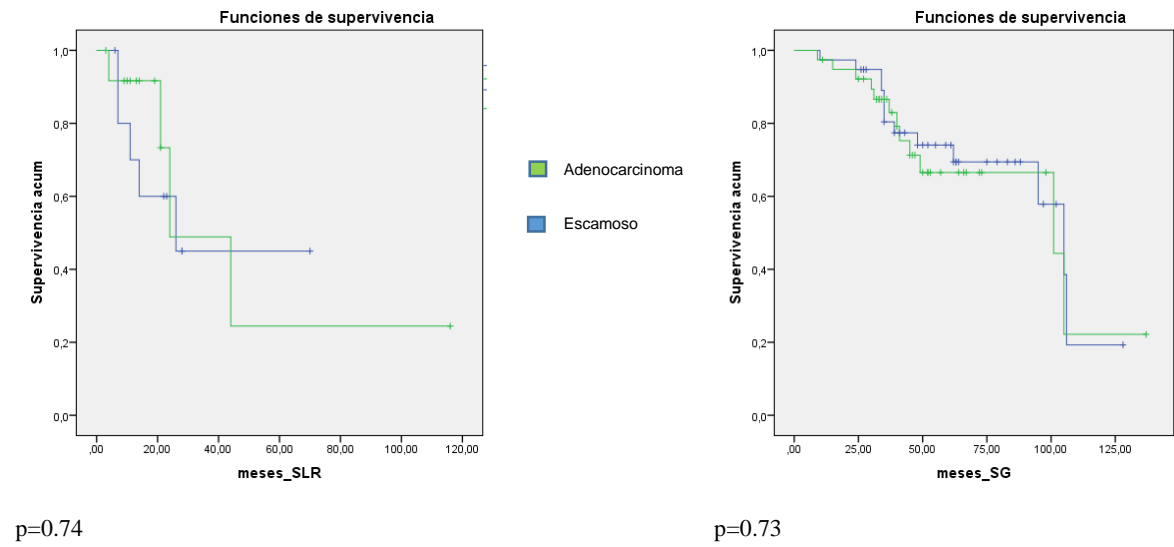


Figura 21: Curvas de SLR y SG según invasión de pleura visceral:

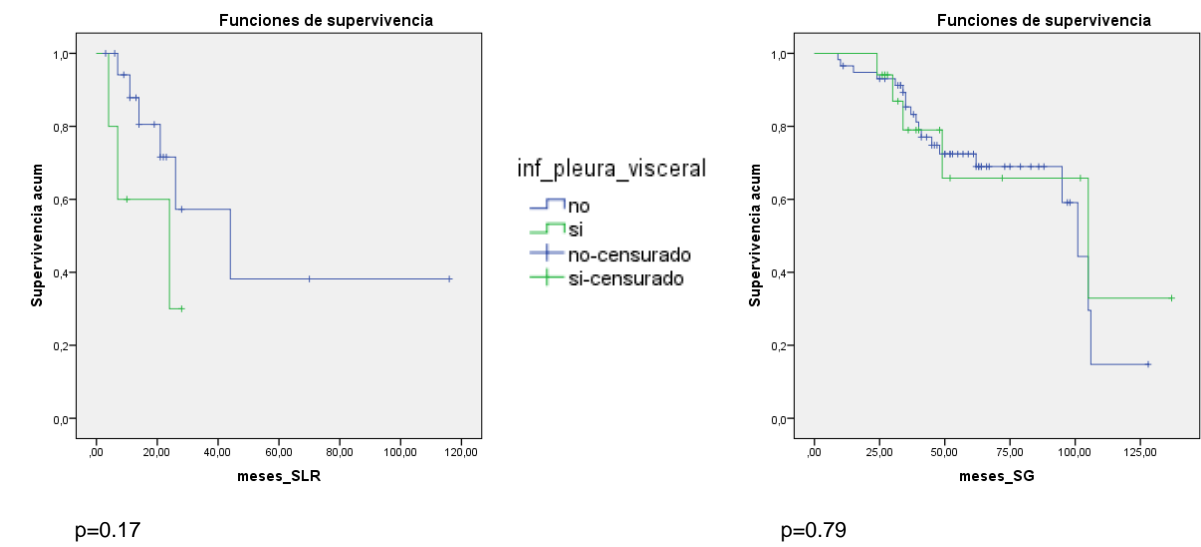
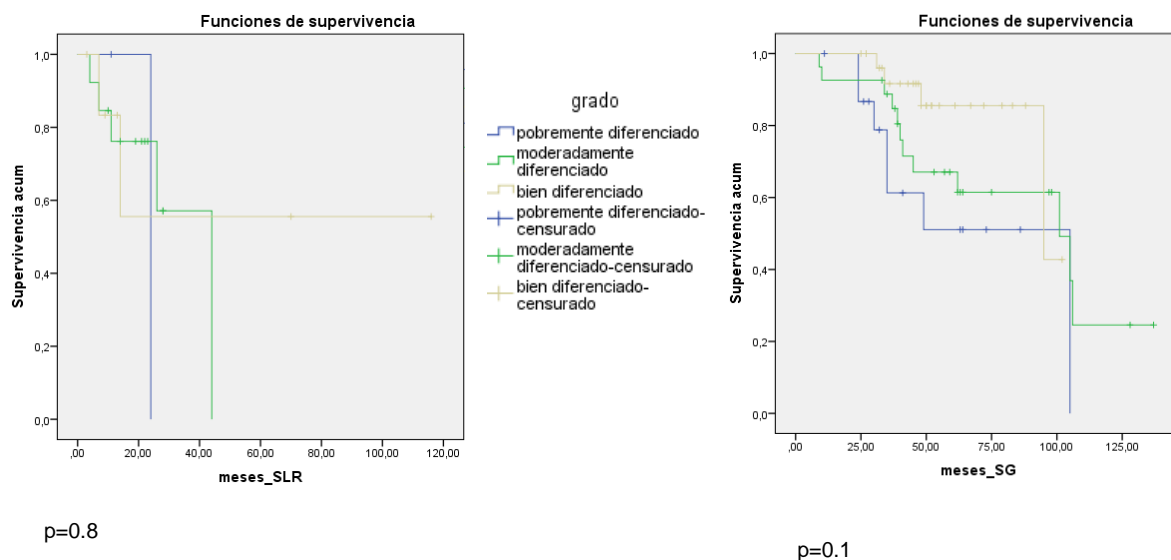


Figura 22: Curvas de SLR y SG según grado de diferenciación:



Encontramos una tendencia hacia la significación en la diferencia en supervivencia global por expresión de ALDH1, siendo ligeramente superior en los pacientes que expresaban ALDH1 (105m vs 95m; $p=0.063$). Además, se comparó la expresión ALDH1 en gradiente (ya que era el más frecuente) frente al resto, sin encontrar tampoco diferencias (Tabla 22; figura 23). Destacar de nuevo que no se ha alcanzado la mediana en este grupo de pacientes.

Tabla 22: Análisis de supervivencia global según expresión de ALDH1

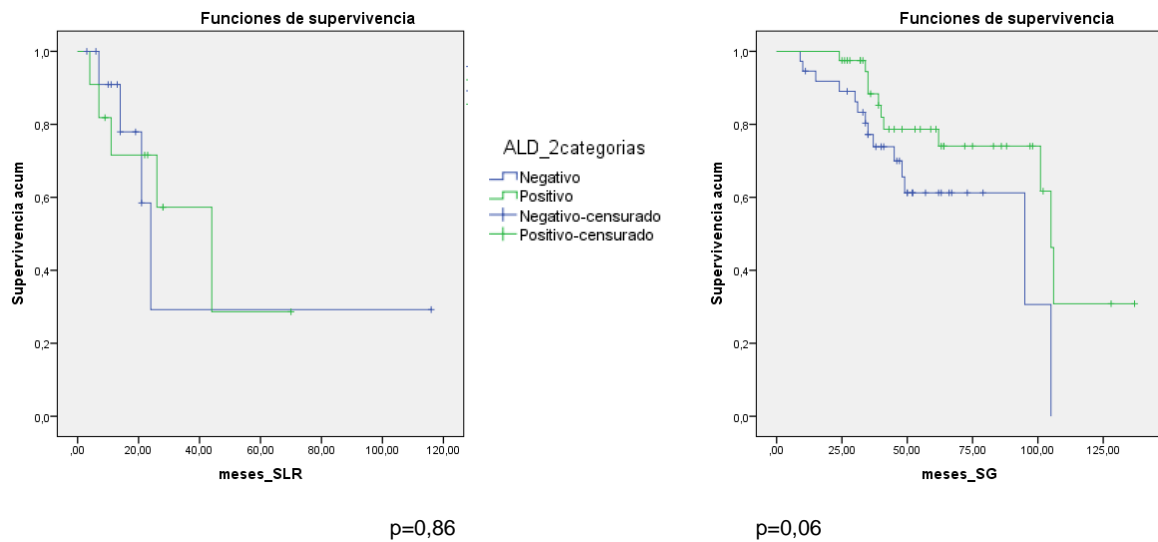
		Mediana (meses)	Intervalo de Confianza 95%	p
ALDH1	Positivo	105	99,72 – 110,27	0,063
	Negativo	95	26,84 – 160,16	
ALDH1 positivo	Gradiente	-	-	0,67
	Otros	101	74,18 – 127,83	

Con la supervivencia libre de recaída ocurre algo similar; no observamos diferencias significativas ni entre los carcinomas ALDH1 positivos y los negativos, ni en cuanto al tipo de expresión en gradiente frente al resto. (Tabla 23)

Tabla 23: Análisis de supervivencia libre de recaída según expresión de ALDH1

		Mediana (meses)	Intervalo de Confianza 95%	p
ALDH1	Positivo	44	99,72 – 110,27	0,86
	Negativo	22	26,84 – 160,16	
ALDH1 positivo	Gradiente	11	3,16 – 18,84	0,14
	Otros	44	17,05 – 70,46	

Figura 23: Curvas de SLR y SG según expresión de ALDH1



La única relación que encontramos entre ALDH gradiente y el resto de las variables fue con el hábito tabáquico, siendo más frecuente este patrón en los pacientes fumadores en el grupo de adenocarcinomas (Tabla 24)

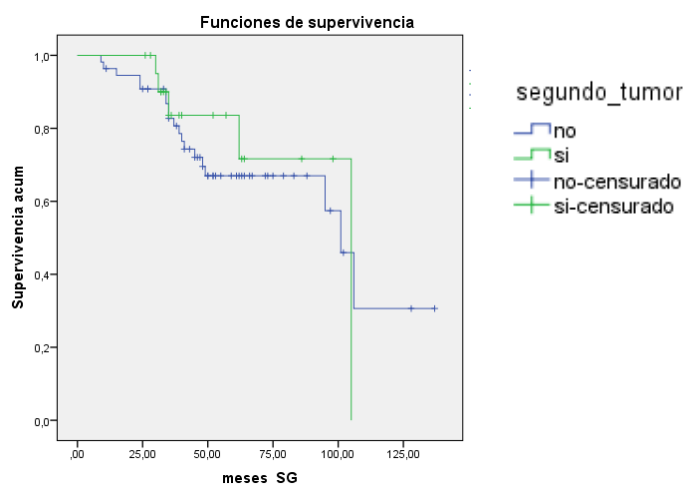
Tabla 24: Relación entre ALDH1 y hábito tabáquico en adenocarcinomas

		HÁBITO TABÁQUICO		TOTAL
		NUNCA/EXFUMADOR	FUMADOR	
ALDH1 POSITIVOS	OTROS	23	11	34
	GRADIENTE	1	4	5
TOTAL		24	15	39

p=0.062

22 Pacientes desarrollaron un segundo tumor a lo largo del seguimiento de su cáncer de pulmón o habían tenido otra neoplasia previamente (tres cánceres renales, dos carcinomas uroteliales de vejiga, cinco cánceres de pulmón, dos cánceres de próstata, un cáncer de laringe, dos cánceres de colon, tres linfomas, dos cánceres de mama, un hepatocarcinoma y una paciente cáncer de mama y colon); no fue factor de riesgo para ello el hábito tabáquico ni la presencia de ALDH1 o CD133. Además, desarrollar un segundo tumor no influyó en su supervivencia (Figura 24)

Figura 24: Curva de SG según desarrollo de segundo tumor



Como comentamos previamente, hubo tres pacientes con expresión nuclear de ALDH1, cuyas características describimos en la tabla 25. Los tres presentaban distinta edad al diagnóstico, distinto patrón de consumo tabáquico y distinto tipo histológico. Hay que destacar que con un seguimiento de más de seis años, los tres pacientes continúan vivos en la actualidad.

Tabla 25: Características de los pacientes con expresión nuclear de ALDH1

	Sexo	Edad	Hábito tabáquico	Tipo histológico	Estado actual	Tiempo de seguimiento
Paciente 1	Varón	66 años	Ex – fumador	Adenocarcinoma	Vivo sin enfermedad	63 meses
Paciente 2	Varón	31 años	No fumador	Mucoepidermoide	Vivo sin enfermedad	61 meses
Paciente 3	Varón	73 años	Fumador	Carcinoma escamoso	Vivo sin enfermedad	96 meses

Realizamos un análisis multivariante, en el que comprobamos que ninguna de las principales variables estudiadas (sexo, hábito tabáquico, tamaño tumoral, grado de diferenciación, invasión de la pleura visceral, expresión de ALDH1) influyen ni en la SLR ni en la SG ni en los carcinomas escamosos ni en los adenocarcinomas (Tablas 26-29). Tampoco al incluir en los adenocarcinomas la presencia de componente lepidico y de mutaciones EGFR ni el CD133.

Tabla 26: Análisis multivariante de supervivencia libre de recaída en pacientes con carcinomas escamosos

Variables	p
Sexo	0.51
Hábito tabáquico	0.19
Grado de diferenciación	0.35
Invasión pleura visceral	0.64
Tamaño tumoral	0.38
ALDH1	0.56

Tabla 27: Análisis multivariante de supervivencia global en pacientes con carcinomas escamosos

Variables	P
Sexo	0.85
Hábito tabáquico	0.94
Grado de diferenciación	0.27
Invasión pleural visceral	0.25
Tamaño tumoral	0.49
ALDH1	0.21

Tabla 28: Análisis multivariante de supervivencia libre de recaída en pacientes con adenocarcinomas

Variables	p
Sexo	0.43
Hábito tabáquico	1
Grado de diferenciación	1
Invasión pleura visceral	0.98
Tamaño tumoral	0.97
ALDH1	1
CD133	0.95
Componente lepidico	0.90
Mutación EGFR	0.85

Tabla 29: Análisis multivariante de supervivencia global en pacientes con adenocarcinomas

Variables	P
Sexo	0.63
Hábito tabáquico	0.84
Grado de diferenciación	0.65
Invasión pleura visceral	0.81
Tamaño tumoral	0.98
ALDH1	0.81
CD133	0.80
Componente lepidico	0.81
Mutación EGFR	0.83

Conclusión: La expresión de ALDH1 en NSCLC estadio I es más frecuente en varones, y dentro del grupo de carcinomas escamosos se asocia a tumores más pequeños.

La expresión citoplasmática de ALDH1 no influye en la supervivencia de los pacientes.

La expresión nuclear de ALDH1 puede estar relacionada con un mejor pronóstico.

La expresión de CD133 se relaciona con una menor tasa de recaídas.

5.4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE ALDH1 Y CD133 CON MUTACIONES EN EGFR EN ADENOCARCINOMAS

Primeramente, se realizó un análisis de los adenocarcinomas en base a la nueva clasificación IASLC/ATS/ERS. Los 39 casos eran adenocarcinomas infiltrantes: 25 eran adenocarcinomas infiltrantes puros y 14 presentaban algún porcentaje de componente lepidico. Los subtipos más frecuentes fueron el patrón acinar y el sólido (Tabla 30)

Tabla 30: Subtipos de adenocarcinoma

	FRECUENCIA	PORCENTAJE
COLOIDE	1	3.9%
SÓLIDO	10	25.6%
MUCINOSO	5	12.7%
ACINAR	12	30.7%
PAPILAR	7	17.8%
LEPÍDICO	4	10.2%
TOTAL	39	100%

En el grupo de pacientes con adenocarcinomas infiltrantes puros observamos un 40% de recaídas, mientras que el grupo con componente lepidico recayeron un 21% de ellos (Tabla 31), sin observar diferencias en supervivencia entre los dos grupos. Además, ninguno de los 5 pacientes con >50% de componente lepidico sufrió recaída

Tabla 31: Relación entre los subgrupos de adenocarcinomas y las recaídas:

		Recaída		Total
		Sí	No	
Adenocarcinoma	Infiltrante puro	40% (10)	60% (15)	25
	Con componente lepidico	21% (3)	79% (11)	14
Total		13	26	39

p=0.2

Se analizaron las mutaciones EGFR en el grupo de adenocarcinomas, observándose mutaciones en 5 casos de los 39 (12.8%); todos ellos eran adenocarcinomas con componente lepidico (1 acinar, 1 papilar y 3 predominantemente lepidicos) (Tabla 32; figuras 25 y 26).

Tabla 32: Características de los pacientes con mutación EGFR

	Sexo	Edad	Tabaco	Subtipo de adenocarc.	Grado	Recaída	Mut. EGFR	SG	ALDH1	CD133
Paciente 1	Mujer	73	Nunca fumadora	2/3 lepidico + 1/3 acinar	1	No	Del19	31m	-	-
Paciente 2	Mujer	85	Nunca fumadora	2/3 lepidico + 1/3 acinar	1	No	Del19	46m	-	+
Paciente 3	Varón	76	Nunca fumador	2/3 Acinar + 1/3 lepidico	2	No	Del19	45m	-	+
Paciente 4	Mujer	74	Nunca fumadora	>2/3 lepidico + acinar	2	No	L858R	105m	-	+
Paciente 5	Mujer	69	Fumador	2/3 Papilar + 1/3 lepidico	3	Sí	L858R	49m	-	-

Figura 25: Componente lepidico de un adenocarcinoma acinar

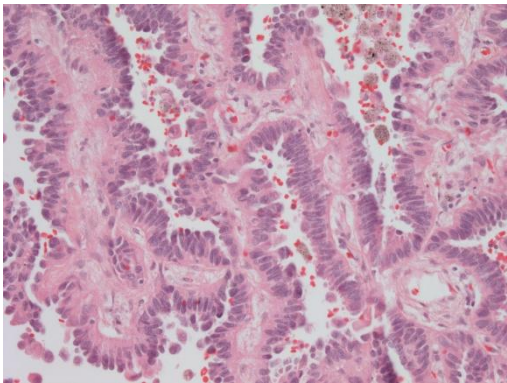
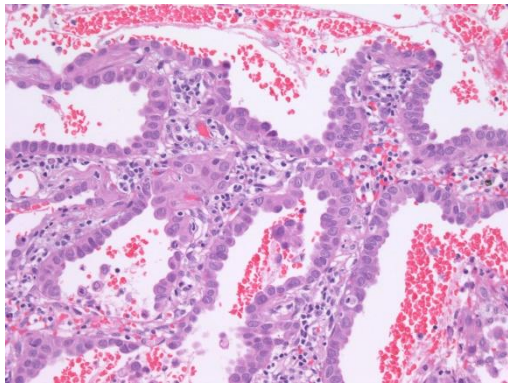


Figura 26: Componente lepidico de un adenocarcinoma papilar



Ninguno de los 25 pacientes con adenocarcinoma sin componente lepidico tenía una mutación EGFR, observando una relación significativa entre el patrón predominantemente lepidico y la presencia de mutación EGFR ($p=0.006$) así como entre la ausencia de componente lepidico y la ausencia de mutación EGFR ($p=0.003$) (Tabla 33). De las cinco mutaciones detectadas, tres eran deleciones del exón 19 y las otras dos L8585R (exón 21). Se muestran en las figuras 27 y 28 las PCR de un caso no mutado y de otro con mutación en exón 19.

Tabla 33: Relación entre la presencia de componente lepidico y mutación EGFR

		MUTACIÓN EGFR		TOTAL
		NO	SI	
COMPONENTE LEPÍDICO	NO	25	0	25
	SI	9	5	14
TOTAL		34	5	39

$p=0.003$

Figura 27: PCR de un tumor EGFR no mutado:

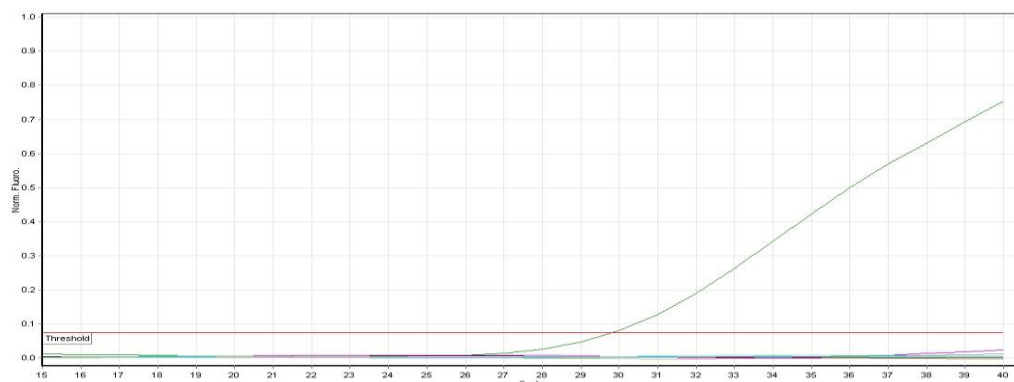
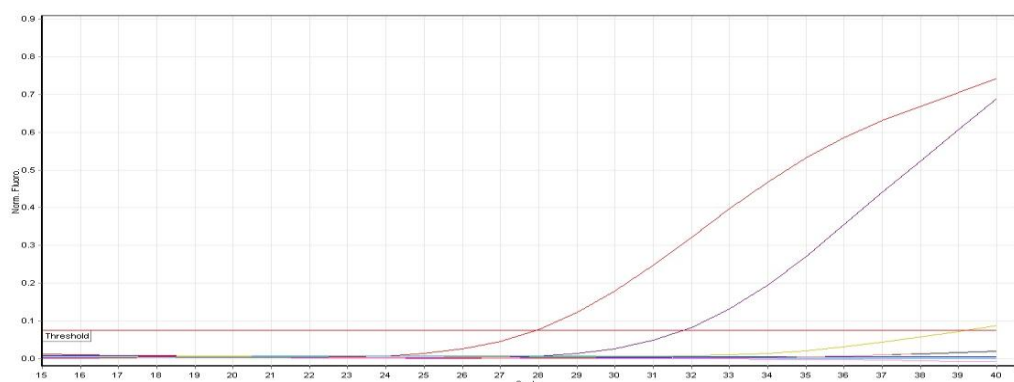


Figura 28: PCR de un tumor con una mutación EGFR en exón 19



Encontramos una relación significativa entre el status EGFR wild type y el sexo varón ($p=0.047$), y entre los pacientes con mutaciones EGFR y el hábito tabáquico “nunca fumador” ($p=0.001$). Además, observamos una tendencia hacia la significación entre la relación EGFR wild type y muerte por cáncer de pulmón ($p=0.067$) (Tabla 34)

Tabla 34: Relación entre mutación EGFR y causa de éxitus:

		MUTACIÓN EGFR		TOTAL
		NO	SI	
CAUSA ÉXITUS	TUMOR PRIMARIO	7	1	8
	OTRAS CAUSAS	1	3	4
TOTAL		8	4	12

$p=0.067$

En cuanto a la relación de mutación EGFR/expresión de ALDH1, encontramos que ninguno de los pacientes con mutación EGFR presenta tinción citoplasmática para ALDH1 (Tabla 35 y figura 29). No encontramos asociación entre la presencia de componente lepidico y la expresión de ALDH1 (Tabla 36), ni entre ninguno de los subtipos de adenocarcinoma y la expresión de ALDH1 (Figura 30)

Tabla 35: Relación entre las mutaciones EGFR y la expresión ALDH1

		ALDH1		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
MUTACIÓN EGFR	NO	20	14	34
	SI	5	0	5
TOTAL		25	14	39

$p=0.09$

Figura 29: Relación entre la mutación EGFR y la expresión de ALDH1

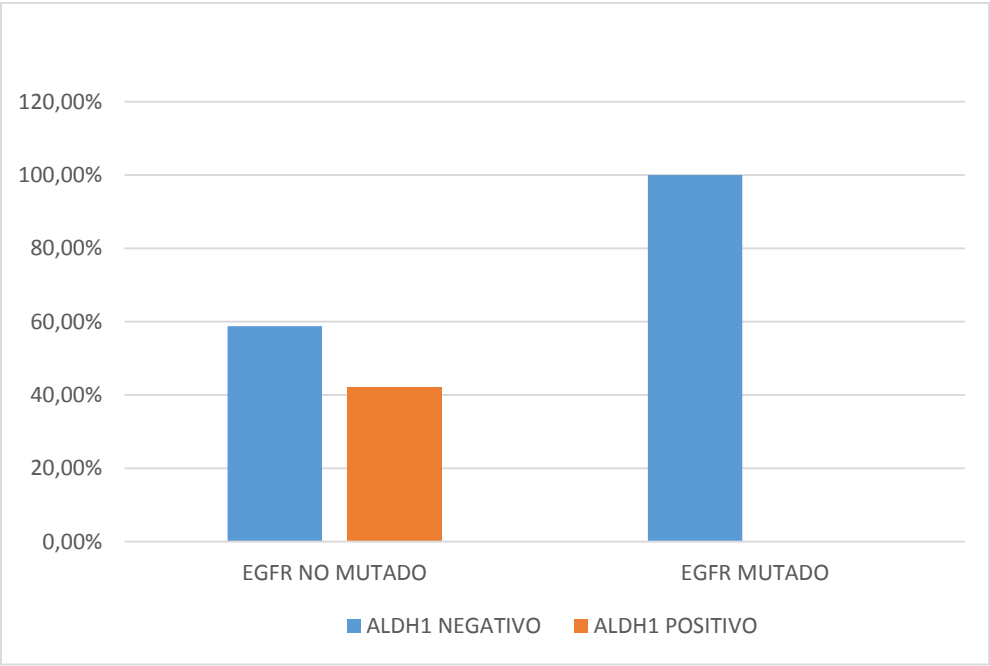
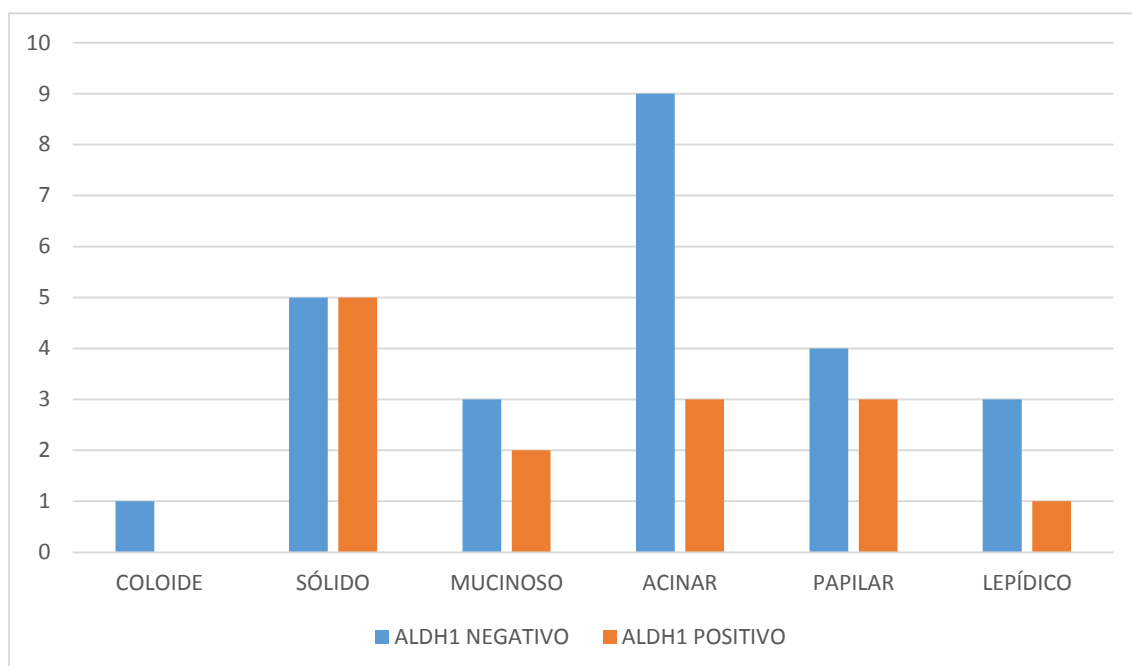


Tabla 36: Relación entre la presencia de componente lepidico y ALDH1

		ALDH1		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
MUTACIÓN EGFR	NO	56% (14)	44% (11)	25
	SI	79% (11)	21% (3)	14
TOTAL		25	14	39

p=0.14

Figura 30: Relación entre los subtipos de adenocarcinoma y la expresión de ALDH1



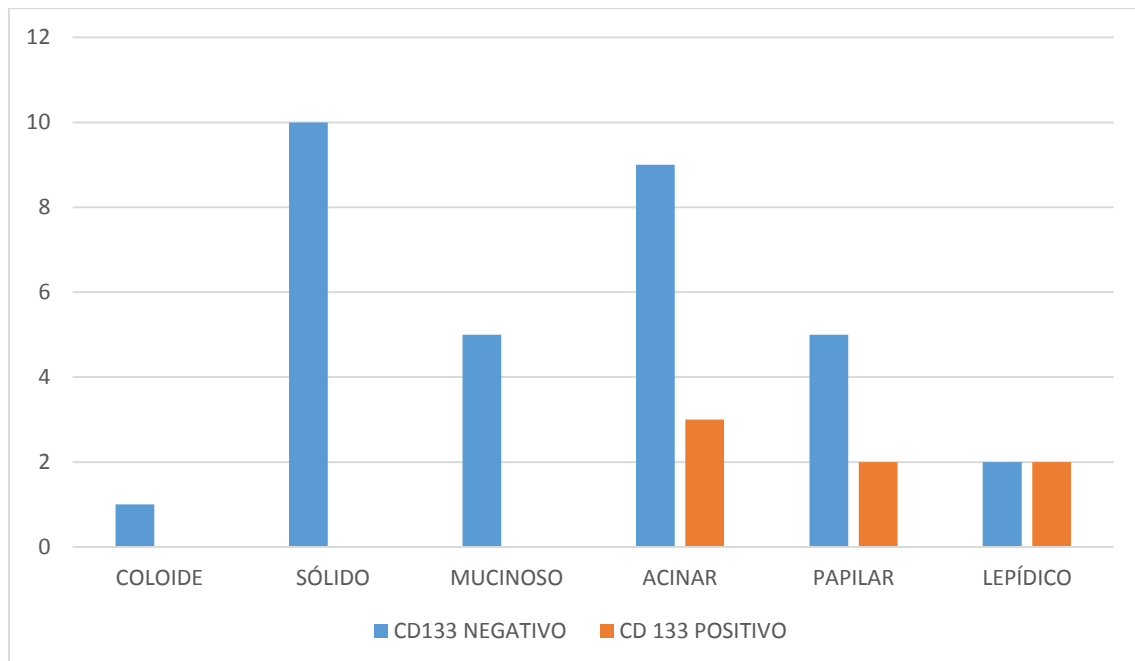
De los 5 pacientes con mutación de EGFR, tres eran CD133+ y dos CD133-. Los tres pacientes CD133+ tenían en común que nunca habían fumado y que presentaban un adenocarcinoma acinar con componente lepidico. No encontramos asociación entre la presencia del componente lepidico y la expresión de CD133 (Tabla 37). En cuanto a los subtipos de adenocarcinoma, tampoco encontramos relación entre ninguno de ellos y la expresión de CD133 (Figura 31)

Tabla 37: Relación entre la presencia de componente lepidico y CD133

		CD133		TOTAL
		NEGATIVO	POSITIVO	
ADENOCARCINOMA	INFILTRANTE PURO	88% (23)	12% (2)	25
	COMPONENTE LEPÍDICO	64% (9)	36% (5)	14
TOTAL		32	7	39

p=0.42

Figura 31: Relación entre los subtipos de adenocarcinoma y la expresión de CD133



De los 5 pacientes con mutación EGFR, sólo 1 sufrió una recaída, falleciendo éste por el cáncer de pulmón. Este paciente presentaba un adenocarcinoma papilar poco diferenciado, mientras que los otros cuatro eran adenocarcinomas acinares bien diferenciados o moderadamente diferenciados.

Conclusión: ALDH1 y CD133 no se asocian con la presencia de mutaciones en EGFR en los adenocarcinomas. Tampoco se asocian con ninguno de los subtipos histológicos de adenocarcinoma ni con la presencia del patrón lepidico.

6. DISCUSIÓN

6.1. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS MADRE TUMORALES MEDIANTE EL ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE ALDH1 Y CD133

6.1.1. CÉLULAS MADRE TUMORALES EN CÁNCER DE PULMÓN:

El cáncer de pulmón causa la muerte a más pacientes que cualquier otro cáncer. La mayoría de los pacientes se diagnostican en estadios avanzados y no pueden beneficiarse de una cirugía curativa. La tasa de supervivencia a los 5 años es muy baja, a pesar de los avances en las técnicas quirúrgicas y en los tratamientos quimioterápicos. La lucha contra el hábito tabáquico y las campañas de prevención del cáncer de pulmón son una primera estrategia en la lucha contra el cáncer, y a la vez clínicos y científicos debemos desarrollar un mejor conocimiento sobre la biología molecular del cáncer, y conseguir diseñar terapias más eficaces.

En comparación con el lento desarrollo de la prevención del cáncer de pulmón y su tratamiento, el conocimiento acerca de la biología de las células madre pulmonar nos está revelando la presencia de poblaciones progenitoras a lo largo de todo el pulmón. Células madre multipotentes han sido identificadas a lo largo de toda la vía aérea, dando lugar a células hijas *transiently amplifying* y *terminally differentiated*²⁴. Las primeras son células progenitoras con capacidad proliferativa limitada y potencial diferenciador restringido, como los neumocitos tipo II y las células de Clara. Las segundas, son células completamente diferenciadas sin capacidad proliferativa, como las células ciliadas y los neumocitos tipo I. Estas células, como las células madre de otros órganos, son

importantísimas para el mantenimiento local de los tejidos y la reparación en caso de haber algún daño.

A pesar de su papel establecido en el mantenimiento de los tejidos, hay datos que apoyan la idea de un origen de la leucemia en células madre²⁵. Parece que las leucemias se pueden desarrollar a partir de la transformación de células madre hematopoyéticas. Así que, las células madre, pueden ser consideradas como pro-tumorigénicas, pudiendo a partir de ciertas mutaciones, inducir crecimientos aberrantes e invasividad en los tejidos.

Las células madre de los tejidos sanos y las células madre tumorales (CMT) parecen compartir ciertas propiedades, como un gran poder diferenciador y una mayor capacidad mitótica que sus células vecinas²⁶. Aunque estas similitudes parecen indicar un origen común de estas poblaciones, hay todavía muchas cuestiones sin resolver al respecto.

La hipótesis acerca de la existencia de CMT se basa en que los tumores están organizados de una manera jerarquizada que contaría con una subpoblación celular con capacidad de auto-regeneración y diferenciación. Estas células tienen capacidad de metastatizar y son quimiorresistentes, dos características que muy probablemente contribuyen a la mala evolución del cáncer de pulmón en estadios iniciales en un alto porcentaje de casos.

Centrándonos en el cáncer de pulmón, se han descrito CMT tanto en líneas celulares como en tejido de tumores en fresco, basados en marcadores de superficie. Se describieron por primera vez en el año 2007²⁷ en líneas celulares de NSCLC gracias al fenotipo *side population*, caracterizado por su comportamiento en el flujo de colorantes vitales por transportadores multidroga

[Hoechst 33342]. Cuando se compararon estas células con las controles, se observó una mayor resistencia a la quimioterapia, invasividad y tumorigenicidad. Estudios posteriores identificaron CMT mediante actividad ALDH aumentada²⁸, y se puso de manifiesto una vez más, su capacidad invasiva y de metastatizar.

A pesar de que hay diversos marcadores de superficie de CMT descritos en NSCLC, no hay consenso acerca de la expresión predominante de uno u otro marcador. Así, se han descrito CD44, CD24, CD133, CD34 y ALDH²⁹. Además, se ha intentado correlacionar la combinación de varios de estos marcadores entre sí³⁰.

6.1.2. LA FAMILIA ENZIMÁTICA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA:

La superfamilia aldehído deshidrogenasa está formada por 19 genes funcionales, con distintas localizaciones cromosómicas³¹; en concreto, la ALDH1 se encuentra en el cromosoma 9. Las enzimas ALDH pueden encontrarse en el citoplasma, en la mitocondria y en el retículo endoplásmico³². Los niveles enzimáticos, tanto en los tejidos como en la distribución en los órganos, pueden variar en función de la familia y subfamilia enzimática.

Catalizan la oxidación de varios aldehídos endógenos y exógenos a sus correspondientes ácidos carboxílicos³³. Los aldehídos son compuestos orgánicos caracterizados por poseer el grupo funcional $-CHO$; se obtienen de la deshidratación de un alcohol. Poseen una vida media larga y juegan un papel fundamental tanto en algunos procesos fisiológicos como en la carcinogénesis de los tejidos.

Los aldehídos endógenos se generan a partir de ciertos procesos metabólicos, incluyendo la peroxidación lipídica, la biotransformación de

neurotransmisores y carbohidratos y en el metabolismo de vitaminas y esteroides. La fuente de aldehídos exógenos incluye la biotransformación de xenobióticos y drogas, como el etanol, así como los que se encuentran en el humo del tabaco, en los gases de los tubos de escape de los vehículos y en la denominada niebla tóxica o *smog*.

Además de la oxidación de los aldehídos, la superfamilia de enzimas ALDH catalizan la hidrólisis del éster (ALDH1A1, ALDH2) y tienen actividad nitrato-reductasa (ALDH2). Algunas enzimas de esta superfamilia tienen funciones no catalíticas, como función antioxidante y estructural (ALDH1A1, ALDH3A1) y como osmo-reguladoras (ALDH7A1)^{32 33}

De todas las familias y subfamilias descritas, las enzimas ALDH involucradas en células madre normales y células madre tumorales incluyen la familia ALDH1, ALDH2, ALDH3, ALDH4 y ALDH7³³. En particular, ALDH1 ha sido utilizada como marcador para identificar y aislar las células madre normal y tumoral, y tanto la ALDH1A1 como la ALDH3A1 han demostrado tener una función fisiológica importante en las células madre.

La primera vez que se consiguió medir actividad intracelular ALDH1 fue descrita por Jones et al en 1995³⁴. Encontraron que el dansyl aminoacetaldehído, un aldehído fluorescente podía ser medido mediante citometría de flujo, y aislar de esta manera células madre hematopoyéticas humanas y células madre de leucemia. Posteriormente se describió el Aldefluor Assay¹¹ cuya estrategia fue similar a la anterior, pero utilizando otro sustrato (BODIPY aminoacetaldehído).

Estudios recientes han demostrado que ALDH1 podría utilizarse como target para stem cell mediante la formación de imágenes in vivo. Esto sería útil y muy atractivo para identificar células madre normal y tumoral ya que no se

necesitaría purificación ni manipulación celular ex vivo. Se han descrito dos nuevos radiotrazadores que podrían tener su utilidad tanto en el SPECT como en el PET³⁵

6.1.2.1. ALDH COMO MARCADOR DE CÉLULAS MADRE

Las células madre se caracterizan por tener capacidad auto-regenerativa y de diferenciarse en células maduras que puedan repoblar tejidos específicos y órganos³⁶. Dependiendo del subtipo de célula madre, una variedad de marcadores específicos de célula madre se pueden usar para aislar dichas células, solos o en combinación con otros marcadores. Por ejemplo, las células madre hematopoyéticas se pueden identificar a través del CD34 y/o CD133³⁷, mientras que las células madre neurales se pueden identificar a través del antígeno de superficie Lewis X o el CD133³⁸. Hay algunos marcadores que parecen universales a la hora de identificar células madre, ya que han sido encontrados en la mayoría de los tejidos, como la ALDH1 y la enzima telomerasa.

Las células madre que expresan ALDH han sido utilizadas en el área de la medicina regenerativa, como por ejemplo, para acelerar la reparación hepática tras un daño tisular³⁹, la cardíaca tras un infarto de miocardio⁴⁰, y la mejoría de la perfusión y el aumento de los vasos sanguíneos en la isquemia de las extremidades⁴¹. Además, las células madre hematopoyéticas aisladas basándose en su fenotipo ALDH1 han sido utilizadas como injerto en los pacientes trasplantados de médula ósea⁴².

6.1.2.2. ALDH COMO MARCADOR DE CÉLULAS MADRE TUMORALES

Los tumores son entidades multicelulares heterogéneas que aparecen cuando se produce un cambio genético o epigenético en una célula normal, rompiendo así la homeostasis normal celular. Estas alteraciones favorecen la proliferación celular descontrolada, diferenciación, migración y el metabolismo de la matriz extracelular, restringiendo la apoptosis, la polaridad celular y la estabilidad de la matriz extracelular. Estos cambios se deben a la adquisición de seis propiedades malignas: autosuficiencia en señales de crecimiento, falta de sensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento, angiogénesis sostenida, evasión de la apoptosis, ilimitado potencial de replicación e invasión de tejidos y metástasis.

Hay evidencias que señalan que las células responsables de la iniciación y mantenimiento de los tumores son realmente células madre tumorales. Aunque las primeras hipótesis datan de hace casi 150 años⁴³, los avances en el área de la identificación y aislamiento celular han hecho resurgir el interés en este área. La primera vez que se describieron las células madre tumorales fue en el año 1994, en la leucemia mieloide aguda, cuando inyectando células precursoras de leucemia CD34+ a ratones inmunodeprimidos, éstos desarrollaban la enfermedad⁴⁴. Los primeros hallazgos en tumores sólidos tuvieron lugar en el año 2003, en pacientes con cáncer de mama, basándose en el fenotipo CD44+CD24-⁴⁵. Este fenotipo había sido identificado previamente como precursor de cáncer de mama, cuando inyectando únicamente 100 células CD44+/CD24- a ratones, éstos desarrollaban cáncer de mama.

Posteriormente, la presencia de ALDH1 detectada mediante inmunohistoquímica se ha postulado como marcador de células madre tumorales

en diversos tumores sólidos, como cabeza y cuello, pulmón, hígado, páncreas, cérvix, ovario, mama, próstata, colon y vejiga.^{46 47 48 49 50 51 52 53 54 28}

Las células madre tumorales con alta cantidad de ALDH1 han demostrado tener mayor capacidad tumorigénica, realzando sus características de células madre, tanto in vitro como in vivo, comparado con aquellas células con baja actividad ALDH1, en tumores de cabeza y cuello, próstata, páncreas, pulmón, cérvix y vejiga. Valga como ejemplo el experimento de Ginestier et al⁵⁵ en ratones inmunodeprimidos. Cuando se trasplantaron 50.000 células de cáncer de mama ALDH1- no se formó ningún tumor, mientras que cuando se inyectaron 500 células ALDH1+, los tumores se desarrollaban en 40 días, demostrando así que las células madre tumorales de cáncer de mama ALDH1+ tenían mayor capacidad tumorigénica. Además, en un estudio de 577 pacientes con cáncer de mama, se encontró que pacientes con tumores ALDH1 positivos tenían una menor supervivencia global comparada con aquellos pacientes con tumores pobres en ALDH1. De manera similar, en dos estudios independientes se analizaron 163 y 269 pacientes con cáncer de próstata, encontrando que aquellos con alta expresión de ALDH1A1 presentaban una menor supervivencia global⁵⁶.

Hay discrepancias acerca del mal pronóstico de los tumores ricos en células ALDH1 en otros tumores, como es el caso del cáncer de ovario. Dos estudios realizados en 2009 y 2010 aportaron datos contradictorios. Se cree que estas diferencias pueden estar basadas en los distintos subtipos histológicos estudiados^{57 15}. Asimismo, también en el año 2010, Rasheed et al describieron una relación entre la alta expresión de ALDH1 y un peor pronóstico en cáncer de páncreas⁵⁸; un año más tarde se publicaron datos opuestos confirmando mal

pronóstico a la baja expresión de ALDH1⁵⁰. En este caso, los autores sugieren como causa de la discordancia diferencias en la metodología de la técnica a la hora de cuantificar la ALDH1.

6.1.2.3. EL PAPEL DE ALDH1 EN CÉLULAS MADRE NORMALES Y TUMORALES

La vía de señalización del ácido retinoico se ha visto implicada en la diferenciación celular, tanto de células madre normales como en tumorales^{59 60 61}. El ácido retinoico y sus derivados están envueltos en muchos procesos fisiológicos importantes, como son la regulación de la expresión génica, la morfogénesis y el desarrollo. La aldehído deshidrogenasa es una de las cuatro enzimas que convierten el retinol (vitamina A) en ácido retinoico. Éste puede actuar sobre su receptor nuclear, uniéndose posteriormente al DNA formando heterodímeros, actuando en la regulación de la expresión génica y diferenciación celular⁶².

Las enzimas ALDHs se reconocen como enzimas detoxificadoras importantes para proteger a las células de varios aldehídos, que de otra manera, serían tóxicos para ellas. Esta idea se ve apoyada por la evidencia de que deficiencias y polimorfismos de varias ALDHs pueden conducir a desarrollar ciertos fenotipos clínicos y enfermedades; algunos ejemplos de ello son la espina bífida (ALDH1A2)⁶³, la hipertensión (ALDH2)⁶⁴, el síndrome de Sjögren-Larsson (ALDH3A2)⁶⁵ y algunos tipos de epilepsia (ALDH7A1)⁶⁶.

ALDH1A1 y ALDH3A1 ofrecen además protección a las células contra ciertos fármacos citotóxicos. Esto fue descrito por primera vez hace más de dos décadas, tanto en células madre hematopoyéticas como de leucemia tratadas

con ciclofosfamida. Ambas isoformas son capaces de convertir la ciclofosfamida a su producto inactivo, la carboxifosfamida⁶⁷. Asimismo, se ha descrito en pacientes con cáncer de mama una mayor resistencia a la quimioterapia neoadyuvante con esquemas de epirrubicina y paclitaxel en aquellos tumores ALDH1+, con un menor número de respuestas patológicas completas en estos tumores en comparación con los ALDH1-⁶⁸

En cuanto a la radioterapia, varios trabajos relacionan la alta expresión de ALDH1 con la radiosensibilidad en tumores cervicales^{69 42}Una de las hipótesis es que la expresión elevada de ALDH1 aumente la síntesis de ácido retinoico, lo cual podría inducir la apoptosis de las células tumorales tras radioterapia. Algunos estudios apuntan a que las células tratadas con ácido retinoico previo a la radioterapia, se convierten en radiosensibles⁶³

Otra hipótesis acerca de las funciones de ALDH1 es su capacidad para expandir las células madre. Algunos autores han demostrado que ALDH1A1 es capaz de inhibir la linfopoyesis y promover la mielopoyesis en modelos de ratón⁷⁰. Tanto en modelos de ratón como en humanos in vitro se ha visto que al inhibir ALDH1 se produce una expansión de la población de células madre hematopoyéticas^{71 42}. Al inhibir ALDH1 se produce un retraso de la transición G0/G1, resultando en un mayor número de células madre hematopoyéticas en fase G0 que en fase G2/S/M. Por lo tanto, podríamos estar ante una diana terapéutica a la hora de conseguir expandir las células madre hematopoyéticas.

El ácido retinoico se utiliza para inducir la remisión en la leucemia aguda promielocítica, ya que induce la diferenciación de las células leucémicas promielocíticas en neutrófilos⁷². Debido a los mecanismos de feedback negativos entre la actividad ALDH y el ácido retinoico, se podría pensar que tratando las

células con alta actividad ALDH1 con ácido retinoico, se podría observar una diferenciación de las células madre tumorales en otras menos agresivas⁷³. De hecho, cuando se trata un modelo celular de cáncer de mama con ácido retinoico, los genes que sufren una downregulation son aquellos asociados a los procesos carcinogénicos, actividad metastásica y resistencia a drogas, y los sobreexpresados son los relacionados con la biosíntesis del tRNA, esencial para la síntesis de proteínas y la viabilidad celular⁶⁰. Los hallazgos de esta investigación sugieren que el tratamiento con ácido retinoico induce la diferenciación de las células madre tumorales del cáncer de mama, y consigue disminuir la población de CMT. Además, otros estudios sugieren que tratando las CMT de cáncer de mama con ácido retinoico se induce una mayor quimio y radiosensibilidad, haciendo así a las CMT menos agresivas⁷⁴.

En cuanto a cáncer de pulmón se refiere, hay un estudio en líneas celulares que pone en evidencia una mayor sensibilidad a la ciclofosfamida al administrar ácido retinoico e inducir una downregulation de ALDH1⁶¹

En el año 2010 se publicó un ensayo clínico fase II en pacientes con cáncer no microcítico de pulmón estadio IIIB/IV en el que se randomizaron a 170 pacientes a recibir quimioterapia con cisplatino-paclitaxel vs el mismo esquema de quimioterapia + ácido retinoico. Los pacientes en tratamiento con ácido retinoico obtuvieron una mayor tasa de respuesta (55.8% vs 25.4%; $p=0.001$) y una mayor supervivencia libre de progresión (8.9m vs 6m; $p=0.008$)⁷⁵. Un estudio fase III se encuentra en marcha en la actualidad con el objetivo de confirmar estos resultados (NCT:01041833)

Una hipótesis distinta a todo lo comentado anteriormente, es el papel de la ALDH1 como una proteína supresora de tumores. Esta idea surgió a raíz de

observar una menor expresión en ciertos tumores de pulmón que en los epitelios normales, tanto bronquiales como alveolares. En una reciente publicación se pone de manifiesto una downregulation de ALDH1 en una importante proporción de adenocarcinomas; dentro de estos, se vio con una mayor frecuencia en aquellos tumores de alto grado, con pobre diferenciación y con gran índice de proliferación. Además, a nivel de cultivos celulares de cáncer de pulmón, al reponer la expresión de ALDH1, el crecimiento de estas células se ve claramente disminuido⁷⁶.

Esta downregulation de ALDH1 se ve con mayor frecuencia en pacientes fumadores, poniendo de manifiesto su papel en la carcinogénesis inducida por tabaco. Al disminuir ALDH1 se produce una acumulación de acetaldehído intracelular procedente del humo del tabaco inhalado. El acetaldehído es un importante carcinógeno que produce adductos en el DNA causando cambios genéticos⁷⁷. Así que, según esta teoría, ALDH1 actuaría como supresor tumoral, especialmente en la carcinogénesis inducida por tabaco.

6.1.2.4. DETECCIÓN DE CÉLULAS MADRE EN CÁNCER DE PULMÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE ALDH1

Hemos encontrado en la bibliografía seis trabajos en los que se determina mediante inmunohistoquímica la ALDH1 en NSCLC. La frecuencia con la que se determina la presencia citoplasmática de ALDH1 es bastante homogénea, encontrándose entre un 45 y un 68% de las muestras estudiadas⁷⁸
^{79 80 81 76}, excepto en uno de los estudios que se describe en un 20%⁸². La población estudiada era heterogénea, en cuanto a extensión de la enfermedad y a los tratamientos recibidos posteriormente, lo cual puede enmascarar los resultados. El estudio que encontró un 20% de ALDH+ se realizó en

adenocarcinomas, que como veremos posteriormente, se asocian con una menor tasa de positividad de ALDH.

Nosotros encontramos un 48% de tumores con ALDH1+ en el global de los tumores analizados, lo cual está en concordancia con los datos publicados. Sólo uno de esos trabajos analizó pacientes en estadio I que no hubieran recibido tratamiento adyuvante (los mismos criterios de inclusión que nuestro estudio), describiendo una positividad de ALDH1 de un 68.7%⁸¹.

Aunque sabemos que en cáncer de pulmón, la actividad aldehído deshidrogenasa por citometría de flujo es equiparable a la detección por inmunohistoquímica, es cierto que la técnica de inmunohistoquímica, en general, tiene mayores diferencias interobservador⁷⁸. Además, hemos encontrado diferencias entre las distintas definiciones de positividad. Ambos aspectos pueden explicar las diferencias encontradas entre los distintos artículos

6.1.3. CD133

También denominado prominina-1, se trata de un antígeno de superficie celular, formado por cinco dominios transmembrana y dos hélices extracelulares. A pesar de que su función biológica no es del todo conocida, sabemos que es coexpresado por las células progenitoras endoteliales y también por células stem hematopoyéticas, pero no por células endoteliales maduras ni por células mieloides⁸³

6.1.3.1. CD133 COMO MARCADOR DE CÉLULAS MADRE

Desde que Yin et al⁸⁴ describieron por primera vez que CD133 estaba presente en células madre hematopoyéticas CD34+, CD133 se convirtió en un marcador molecular para la identificación y separación de células madre, debido

a su característica de downregulation en las células diferenciadas. Posteriormente fue publicado el alto poder de clonogenicidad y de tasa de éxito en trasplante de las células CD133/CD34⁸⁵. Además, Gallecher et al⁸⁶ comunicó que en sangre de cordón humano, la población celular CD133+ era la única capaz de formar células CD34+. Además, las células CD133+ demostraron tener más capacidad de trasplante en ratones inmunodeprimidos que aquellas CD133-. Esto ya ha sido probado en humanos y publicado en 2005, cuando se trasplantaron cinco pacientes utilizando células madre CD133+ de donantes no compatibles, sin observar reacciones letales agudas ni crónicas de enfermedad injerto contra huésped⁸⁷.

Además, al igual que otras proteínas de superficie características de células madre y precursoras, CD133 ha sido descrito en otros campos celulares distintos al sistema hematológico, incluyendo células precursoras endoteliales⁸⁸, células madre cerebrales fetales⁸⁹, células endoteliales embrionarias⁹⁰, células madre epiteliales prostáticas⁹¹ y células musculares⁹².

6.1.3.2. CD133 COMO MARCADOR DE CÉLULAS MADRE TUMORALES

Singh et al⁹³ comunicaron por primera vez la posibilidad de utilizar CD133 como marcador de CMT cerebrales. Demostraron que estas células tenían una mayor capacidad de proliferación, autorregeneración y diferenciación. Por otra parte, estas células podían diferenciarse en células tumorales cerebrales.

Olempska et al⁹⁴ publicaron que CD133 y ABCG2 estaban upregulados en líneas celulares de carcinoma pancreático, sugiriendo su papel como marcador de CMT pancreáticas. Hermann et al⁹⁵ confirmaron la presencia

de células CD133 en tejido de cáncer de páncreas. Además, CMT de cáncer de colon y hepatocarcinoma humanos aisladas mediante el marcador CD133 mostraron esa capacidad regenerativa, diferenciadora, clonogénica y proliferadora observada previamente in vitro. Además, cuando se inoculaban células CD133+ en ratones inmunodeficientes, estas células eran capaces de re-originar el tumor original del que provenían^{96 97}.

6.1.3.3. DETECCIÓN DE CÉLULAS MADRE EN CÁNCER DE PULMÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE CD133

En el año 2008 se describió a la población de células CD133+ como una población tumorigénica en cáncer de pulmón⁹⁸; las células de cáncer de pulmón CD133+ inoculadas en ratones inmunodeprimidos eran capaces de reproducir el tumor original, a diferencia de la población celular tumoral CD133-.

Numerosos estudios se han publicado en los últimos cinco años utilizando CD133+ como marcador de CMT en cáncer de pulmón, lo cual ha dado lugar a la comunicación de tres metaanálisis a lo largo del año 2014^{99 100 101}.

Centrándonos en cáncer de pulmón estadio I, cinco estudios han utilizado el marcador CD133 mediante inmunohistoquímica como método de detección de CMT^{81 102 103 82 78}. Los casos CD133+ varían entre un 27 y un 51%. Nosotros encontramos una tasa de positividad de un 9%. Esta clara diferencia puede deberse a los diferentes anticuerpos utilizados; nosotros utilizamos un anticuerpo policlonal de Biorbyt, mientras que los otros cinco estudios utilizaron anticuerpos de Miltenyi Biotec y de Abcam. Además, los distintos puntos de corte a la hora de analizar la inmunohistoquímica, pueden ser los responsables de esta

variabilidad entre estudios. Se consideró como positivo desde >1% en algunos casos hasta >20% en otros casos.

6.1.4. CO-EXPRESIÓN ENTRE ALDH1 Y CD133

Debido a la dificultad para identificar CMT con métodos inmunohistoquímicos, parece lógico pensar que utilizar más de un marcador puede resultar clarificador.

Como ya hemos comentado previamente, en cáncer de pulmón se han utilizado como marcadores de célula madre tumoral ALDH1, CD133, CD24, CD34, CD44, y β -catenina.

Si ALDH1 y CD133 son ambos marcadores de CMT, deberíamos de poder identificarlos en las mismas células tumorales para poder realizar dicha aseveración. En nuestro estudio fueron marcadores independientes, es decir, ningún paciente con expresión de CD133 presentaba expresión de ALDH1, y es por ello que creemos que la correlación de estos dos marcadores no pueden ser utilizados para identificar CMT en NSCLC estadio I.

Otros tres estudios han estudiado esta misma correlación. Tanto en el estudio de Sullivan et al como en el de Okudela et al. la expresión de CD133 y ALDH1 fue independiente una de otra. Sólo en el estudio de Alamgeer se demostró una coexpresión de ambos marcadores en el 33% de los casos; además, los pacientes que sobreexpresaban CD133 y ALDH1 eran los que tenían la menor supervivencia libre de recaída y la menor supervivencia global.

Es posible que las CMT expresen diferentes marcadores en distintos tumores o tipos histológicos, o en respuesta a distintas situaciones.

Puesto que la expresión de ALDH1 es más frecuente en carcinomas escamosos y el CD133 en adenocarcinomas, es posible que ambos marcadores no puedan ser utilizados en combinación para aislar CMT en el global de NSCLC.

6.2. CUANTIFICACIÓN Y VALORACIÓN DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE ALDH1 Y CD133

Todos los estudios publicados acerca de la expresión de ALDH1 en distintos tumores, localizan esta enzima en el citoplasma. En nuestra serie, encontramos tres pacientes en los que la ALDH1 se expresaba en el núcleo¹⁰⁴.

Fuera del ámbito oncológico, únicamente se ha descrito la ALDH1 en el núcleo en la córnea¹⁰⁵. La expresión citoplasmática de ALDH1 en la córnea parece jugar un papel importante en la visión, el desarrollo embrionario y la neurotransmisión; también parece proteger al ojo del daño inducido por ultravioletas y tener asimismo un papel estructural.

La hipótesis de que la expresión nuclear de ALDH1 pueda tener un papel como factor regulador de mitosis proviene de la observación de la relación inversa entre la expresión de ALDH1 y la tasa de proliferación celular. En la córnea se observa que una alta tasa de proliferación epitelial se asocia con una menor expresión de ALDH1, y que cuando se transfiere ALDH1, el epitelio corneal muestra una menor tasa de crecimiento y una mayor duración del ciclo celular.

En consonancia con estos hallazgos descritos en la córnea, los tres pacientes que en nuestra serie expresaban ALDH1 en el núcleo, se encontraban vivos seis años después, sin tener otro factor pronóstico conocido en común.

De los otros 37 pacientes con ALDH1 positivo, encontramos distintas formas de expresión citoplasmática. Una gran mayoría presentaba una expresión que denominamos en gradiente, que se caracterizaba por tener grupos de células de mayor intensidad en el centro del grupo de células positivas

que en la periferia; otro pequeño grupo de pacientes presentaba una expresión difusa de ALDH1, y el resto no tenía un claro patrón definido, expresándose bien en grupos focales o bien en forma de células aisladas repartidas por el tumor.

Esta diferencia en las formas de expresión citoplasmática no ha sido descrita previamente; únicamente Gamallo C et al. encontraron que en 6 casos de carcinomas epidermoides de laringe sometidos a cirugía, la expresión difusa se asoció a tumores pobremente diferenciados y a una buena respuesta al tratamiento con radioterapia (datos no publicados)

Desconocemos si estas distintas formas de expresión citoplasmáticas pueden jugar algún papel en las funciones de ALDH1.

En el caso de CD133 la expresión de membrana fue difusa en todos los casos, y no está descrita en la bibliografía ninguna forma específica de expresión.

6.3. ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN CON LAS DISTINTAS VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS Y CON LA SUPERVIVENCIA.

6.3.1. EXPRESIÓN NUCLEAR DE ALDH1

Como ya comentamos previamente, es la primera vez que se describe la expresión nuclear de ALDH1. En cuanto a su relación con las variables clinicopatológicas, los tres pacientes eran varones; no encontramos relación con el hábito tabáquico (un paciente era fumador, otro ex fumador y el tercero no fumador) ni con el tipo histológico (uno era adenocarcinoma, otro carcinoma escamoso y el tercero mucoepidermoide). Tampoco con el grado de diferenciación del tumor. Sin embargo, los tres eran tumores pequeños (menores de 2 centímetros) y ninguno de ellos presentaba invasión de pleura visceral.

Los tres pacientes continúan libre de enfermedad en la actualidad, con un tiempo mínimo de seguimiento de 60 meses.

La hipótesis de que la expresión nuclear de ALDH1 tenga un papel como factor regulador de mitosis puede estar detrás de este buen pronóstico.

6.3.2. EXPRESIÓN CITOPASMÁTICA DE ALDH1

Seis artículos han analizado previamente el papel de la expresión citoplasmática de ALDH1 en NSCLC detectado por inmunohistoquímica, así como su relación con algunas variables clinicopatológicas: (Tabla 38)

- Sexo: tres estudios habían estudiado la relación entre el sexo y la expresión de ALDH1 sin encontrar diferencias; nuestro trabajo es el primero que establece una relación positiva entre el sexo varón y la expresión de ALDH1.

- Edad: no existe relación entre la edad al diagnóstico del cáncer de pulmón y la expresión de ALDH1. En nuestra serie encontramos una media de edad al diagnóstico de 63 años en el caso de ALDH1- y 66 años en el caso de ALDH1+; este dato no está especificado en el resto de estudios.

- Hábito tabáquico: el estudio de Li et al. relacionó la exposición al tabaco con la expresión de ALDH1. Sabemos que el cáncer de pulmón está asociado al tabaco, y que éste contiene ciertos carcinógenos, entre ellos, aldehídos. Los autores de este estudio sugieren que los fumadores expresan una mayor cantidad de ALDH1 para así catalizar su oxidación en ácidos carboxílicos. Esta hipótesis contrasta con lo que describen Okudela et al. en su publicación: existe una downregulation de ALDH1 en fumadores, en especial en adenocarcinomas; según esto, los carcinógenos del tabaco alterarían la expresión de ALDH1, provocando así una acumulación intracelular de aldehídos. Estos aldehídos son capaces de formar adductos en el DNA induciendo la formación de mutaciones genéticas. Según esto, ALDH1 podría actuar como una proteína supresora de tumores, en especial en la carcinogénesis inducida por tabaco. En el resto de trabajos publicados no se ha visto relación entre el hábito tabáquico y la expresión de ALDH1, en consonancia con nuestro estudio.

- Tamaño tumoral: no existe relación entre el tamaño tumoral y la expresión de ALDH1 en ninguno de los artículos publicados hasta ahora.

- Tipo histológico: acorde con lo publicado hasta ahora, en nuestro estudio encontramos una mayor expresión de ALDH1 en los carcinomas escamosos que en los adenocarcinomas (68% vs 34%; $p=0.004$).

- Grado histológico: la única relación descrita entre el grado y la expresión de ALDH1 fue publicada por Okudela et al, encontrando un mayor porcentaje de carcinomas bien diferenciados.

- Invasión de pleura visceral: a pesar de ser factor pronóstico en NSCLC, nunca antes se había estudiado su relación con la expresión de ALDH1. En nuestra serie, no encontramos diferencias entre los tumores ALDH1+ y ALDH1-

- Supervivencia: tras observarse en cultivos celulares que las células ALDH1+ poseían propiedades de stem-cell, favorecían el desarrollo y progresión del cáncer de pulmón y tenían mayor capacidad para migrar, se adoptó la hipótesis de que los pacientes con expresión de ALDH1 tendrían un peor pronóstico. Así ha sido descrito en varias publicaciones al respecto, donde se demuestra una menor supervivencia en pacientes ALDH1+.

En nuestra serie, como en el estudio de Okudela et al. no existen diferencias ni en la supervivencia libre de recaída ni en la supervivencia global entre los pacientes ALDH1+ y ALDH1-. Puesto que en el epitelio bronquial y alveolar no tumoral se puede observar expresión de ALDH1, el hecho de que algunos tumores pierdan la expresión de ALDH1 se ha postulado como mecanismo carcinógeno en el pulmón. En esta misma publicación se hace alusión al trabajo de Patel et al, y cotejando los datos con la publicación original, encontramos que, contraria a esta hipótesis, hay un aumento significativo en la expresión de ALDH1 en la transición desde neumocitos normales a neumocitos atípicos, y que este aumento persiste a través de la transformación maligna hasta adenocarcinoma invasivo¹⁰⁶.

Como ya hemos comentado previamente, ALDH1 cataliza la oxidación del retinol en ácido retinoico, induciendo una detención del crecimiento y de la diferenciación. Esta detención en el crecimiento fue demostrada en líneas celulares de cáncer de próstata silenciando epigenéticamente la expresión de ALDH1, a través de hipermetilación de su promotor¹⁰⁷. Por ello, parece razonable considerar que la pérdida de expresión de ALDH1 pueda promover la carcinogénesis a través de este mecanismo.

Otro estudio publicado recientemente describe la expresión de ALDH1 como factor de buen pronóstico en NSCLC¹⁰⁸. La metodología utilizada difiere de los trabajos expuestos con anterioridad y con el nuestro, puesto que en este caso, la técnica utilizada para medir la expresión de ALDH1 fue la inmunofluorescencia.

Asimismo, la expresión de ALDH1 se ha asociado a buen pronóstico en otros tumores, como en el cáncer de ovario o en el cáncer de páncreas^{15 50}

Puede ser que la ALDH1 tenga distintas funciones en los diferentes órganos y tumores, e incluso dentro de un mismo órgano en los distintos tipos histológicos. Además, desconocemos también la diferencia de función en relación a la localización de su expresión (núcleo o citoplasma), así como las distintas formas de expresión citoplasmáticas que hemos descrito en nuestro estudio.

Es importante destacar que la forma en la que se ha detectado ALDH1 es distinta en los diferentes artículos publicados, utilizando diversos anticuerpos y distintos puntos de corte para la definición de su positividad. Esto dificulta la interpretación de los resultados y puede explicar la heterogeneidad en los mismos.

Tabla 38: Relación entre la expresión de ALDH1 y las variables clinicopatológicas en las distintas publicaciones en NSCLC y en nuestra serie.

	Sexo	Edad	Háb. tabáquico	Tamaño tumoral	Tipo histológ.	Grado	Invasión pleura	SLR	SG
Alamgeer et al⁸¹. 2013	SD	SD	SD	SD	Carcinoma escamoso	NR	NR	↓	↓
Okudela et al⁸². 2012	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	↓	NR
Li et al⁷⁹. 2011	NR	NR	Fumador	SD	NR	SD	NR	NR	↓
Zenke et al⁸⁰. 2013	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	↓	NR
Okudela et al⁷⁶. 2013	SD	SD	No fumad	SD	Carcinoma escamoso	Bien diferenc	NR	SD	SD
Sullivan et al⁷⁸. 2010	SD	SD	SD	NR	Carcinoma escamoso	NR	NR	NR	↓
López et al	♂	SD	SD	SD	Carcinoma escamoso	SD	SD	SD	SD

SLR: supervivencia libre de recaída; SG: supervivencia global; NR: no reportado; SD: sin diferencias

6.3.3. EXPRESIÓN DE CD133

Las numerosas publicaciones acerca de la expresión de CD133 en NSCLC han dado lugar a la publicación de tres metaanálisis en los últimos dos años^{99 100}

Centrándonos en el estadio I, cinco estudios han explorado el papel del CD133 en el pronóstico de la enfermedad (Tabla 39). En consonancia con el resto de datos publicados, en nuestra serie de casos no encontramos relación entre la expresión de CD133 y la edad media al diagnóstico, el sexo, el tamaño y el grado de diferenciación. Por primera vez, analizamos la relación con la invasión pleural, sin encontrar tampoco diferencias. En cuanto al tipo histológico, y al igual que en los estudios de Alamgeer y Sullivan, observamos una mayor expresión de CD133 en adenocarcinomas; es más, en nuestra serie, los siete casos positivos eran todos adenocarcinomas.

Ninguno de estos siete pacientes CD 133+ sufrió una recaída. A pesar de que esto no impactó en un aumento en supervivencia, es importante destacar que este grupo de pacientes no ha alcanzado todavía la mediana en supervivencia global.

Este resultado se opone al publicado por Okudela y Woo; en sus estudios la expresión de CD133 se relacionó con una disminución en la supervivencia libre de recaída. Los datos en supervivencia global no han sido reportados hasta la fecha. Tal y como hemos comentado previamente, una posible explicación para esta diferencia es la diversidad en los anticuerpos utilizados para la detección de CD133, así como los niveles de positividad para la evaluación de CD133. Ambos estudios cuentan con más del doble de casos que nuestra serie, algo que también puede influir en los resultados.

En el resto de estudios en NSCLC estadio I no se ven diferencias ni en supervivencia libre de recaída ni en supervivencia global en función de la expresión de CD133.

Tanto Wu et al como Wang et al describen en sus correspondientes metaanálisis una menor supervivencia global en NSCLC con expresión de CD133. Resulta llamativo que en estos mismos trabajos no se observe asimismo una relación entre CD133 y una menor supervivencia libre de recaída. Ambos metaanálisis tienen ciertas limitaciones, como la heterogeneidad de los estudios incluidos, con pacientes en estadio I hasta el IV, los tratamientos adyuvantes recibidos, la forma de calcular los riesgos relativos y los distintos valores de corte para determinar la expresión de CD133.

A pesar de que en múltiples estudios se ha descrito CD133 como marcador de CMT, un mayor conocimiento acerca de la función de esta proteína, podría ser de gran ayuda para aclarar su papel como factor pronóstico en cáncer de pulmón.

Tabla 39: Relación entre la expresión de CD133 y las variables clinicopatológicas en las distintas publicaciones en NSCLC estadio I y en nuestra serie

	Sexo	Edad	Háb. tabáquico	Tamaño tumoral	Tipo histológ.	Grado	Invasión pleura	SLR	SG
Alamgeer et al⁸¹. 2013	SD	SD	SD	SD	Adenocarc	NR	NR	SD	SD
Okudela et al⁸². 2012	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	↓	NR
Li F et al¹⁰². 2011	SD	SD	SD	SD	SD	SD	NR	SD	NR
Woo et al¹⁰³. 2011	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	↓	NR
Sullivan et al⁷⁸. 2010	SD	SD	No fumad	SD	Adenocarc	SD	NR	SD	SD
López et al	SD	SD	SD	SD	Adenocarc	SD	SD	SD	SD

SLR: supervivencia libre de recaída; SG: supervivencia global; NR: no reportado; SD: sin diferencias

6.4. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE EXPRESIÓN DE ALDH1 Y CD133 CON MUTACIONES EN EGFR EN ADENOCARCINOMAS

No hay ninguna publicación hasta la fecha que haya explorado la relación entre la expresión de estos dos marcadores de CMT y las mutaciones de EGFR. En nuestra serie, ninguno de los pacientes con EGFR mutado presenta positividad para ALDH1; tres de ellos eran CD133+.

El receptor del factor de crecimiento epidérmico se encuentra en la superficie celular y se activa mediante la unión de sus ligandos específicos; tras la activación del factor de crecimiento por sus ligandos, el EGFR sufre una transformación de una forma monomérica inactiva a una forma dimérica activa. La dimerización del EGFR estimula la actividad intrínseca de la proteína intracelular tirosina quinasa. Así, se activan las cascadas de transducción de varias señales que conducen a la síntesis de ADN y a la proliferación celular.

Las dos mutaciones más frecuentes en EGFR son la delección del exón 19 y la sustitución de leucina por arginina en el exón 21 L858R; representan más del 90% de las mutaciones, y afectan al dominio tirosín kinasa del receptor. Estudios previos en líneas celulares de cáncer de pulmón y en ratones transgénicos han mostrado que estas mutaciones en EGFR confieren potencial oncogénico^{109 110}.

En pacientes con NSCLC en estadio IV, las mutaciones en EGFR se asocian con un mejor pronóstico, además de ser factor predictor de respuesta a los tratamientos con inhibidores tirosín quinasa (TKIs) (erlotinib, gefitinib)^{111 112}. En pacientes con NSCLC en estadios iniciales hay menos datos al respecto, tanto de su papel como factor pronóstico como del posible beneficio de los TKIs en el ámbito de la adyuvancia del cáncer de pulmón.

Algunos factores clínicos, como son el sexo femenino, pacientes no fumadores, etnia asiática e histología de adenocarcinoma son los parámetros encontrados con mayor frecuencia con las mutaciones activadores en el dominio tirosín-quinasa de EGFR^{113 114 115}

Cuatro ensayos clínicos prospectivos, todos ellos realizados en pacientes asiáticos, habían demostrado que tanto gefitinib^{113 116 117} como erlotinib¹¹⁸ en primera línea versus quimioterapia, aumentaba la supervivencia en los pacientes mutados.

En febrero del 2012 se publicó el primer ensayo clínico fase III en pacientes de raza blanca en el que se randomizaba a los pacientes a recibir erlotinib frente a quimioterapia estándar (cisplatino + docetaxel o cisplatino + gemcitabina, a criterio del investigador) en primera línea en pacientes con NSCLC en estadio IV y mutaciones en EGFR¹¹². Fue un estudio diseñado por el Grupo Español de Cáncer de Pulmón, en el que participaron más de 40 hospitales en España, Francia e Italia. Se incluyeron un total de 174 pacientes, de los cuales 115 eran portadores de la delección en el exón 19 y 58 pacientes presentaban la mutación en el exón 21. Los pacientes que recibieron erlotinib tuvieron una mayor supervivencia libre de progresión (9.7 meses vs 5.2 meses; HR 0.37; 95% CI 0.25-0.54; $p < 0.0001$). Los subgrupos de pacientes que más se beneficiaron de recibir erlotinib fueron los no fumadores, aquellos con performance status 0-1, adenocarcinomas y con la delección en el exón 19.

Casi un 80% de los pacientes en el brazo de la quimioterapia recibió tratamiento con un TKI posteriormente; puede ser éste el motivo por el que no se alcanzó la diferencia en supervivencia global entre los dos grupos (19.3 meses vs 19.5 meses; HR 1.04. 95% CI 0.65-1.68; $p = 0.87$).

La mayor serie de casos de NSCLC en estadios iniciales en la que se ha realizado el análisis de mutaciones de EGFR fue publicado a finales del 2012¹¹⁹. 1118 pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de pulmón en estadios I-III participaron en este análisis; los resultados se obtuvieron previo al inicio del tratamiento adyuvante. Algunos pacientes con mutaciones en EGFR fueron tratados con TKIs durante dos años, tras recibir además el tratamiento estándar con quimioterapia basada en platino. Un 20% del total presentaban mutaciones en EGFR, y acorde con lo que ocurre en la enfermedad metastásica, estas mutaciones fueron más frecuentes entre los no fumadores.

Los pacientes con mutaciones en EGFR presentaban una mayor supervivencia global (HR 0.51; 95% CI 0.34-0.76, $p < 0.001$). Además, aquellos pacientes que recibieron TKIs durante la adyuvancia, presentaban una mayor supervivencia libre de enfermedad (HR 0.43; 95% CI: 0.26-0.72, $p = 0.001$), aunque no alcanzaron una mayor supervivencia global estadísticamente significativa. Un 73% de los pacientes portadores de la mutación en EGFR presentaban un estadio I, un 14% un estadio II y un 13% un estadio III.

Posteriormente, Izar et al¹²⁰ llevaron a cabo un análisis retrospectivo en pacientes con NSCLC estadio I sometidos a resección quirúrgica, analizando tasas de recidiva, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en pacientes con mutación en EGFR frente a wild type. Ninguno de ellos había recibido terapia adyuvante. Con este tipo de análisis, como es el nuestro, es posible examinar el valor pronóstico puro del status mutacional de EGFR en estadios iniciales de NSCLC. 307 pacientes fueron incluidos en este estudio, el 20% de ellos eran portadores de una mutación EGFR. Es importante destacar que más del 95% eran población blanca. La presencia de mutaciones EGFR se

asoció con una menor tasa de recurrencia (9.7% versus 21.6%; $p=0.03$), una mayor supervivencia libre de enfermedad (8.8 vs 7 años; $p=0.0085$) y una mayor supervivencia global a los cinco años (98% versus 73%; $p=0.003$). Las mutaciones más frecuentemente observadas fueron la L858R y deleciones en el exón 19, presentes en el 48% y en el 39% de los casos respectivamente. La gran mayoría de los pacientes tenía una única mutación, pero en dos pacientes se observaron dos mutaciones simultáneas (T790 + L858R y T790 + del19).

En nuestra muestra, encontramos un 13% de mutaciones EGFR, lo cual se encuentra en el rango descrito en la enfermedad metastásica. Dentro de los parámetros clínicos hay que destacar que la mayoría de ellos eran mujeres y no fumadoras. Las dos mutaciones presentes en nuestros pacientes fueron L858R y del19. Aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas, hay una tendencia a que los pacientes con EGFR wild type fallezcan por cáncer de pulmón comparado con los pacientes con mutaciones en EGFR, que suelen fallecer por otra causa (88% vs 25%; $p=0.067$). Es posible que nuestros resultados se vean enmascarados por el pequeño tamaño.

Ninguno de los pacientes con mutación en EGFR tenía expresión citoplasmática de ALDH1; no hemos encontrado nada publicado al respecto, pero si tenemos en cuenta que las mutaciones EGFR confieren un mejor pronóstico a estos pacientes, es de esperar que carezcan de marcadores de CMT. A pesar de que todos los pacientes con mutación EGFR eran ALDH-, esta diferencia no resultó significativa, debido al gran número de casos ALDH- entre el grupo de adenocarcinomas.

Lo único que hay explorado al respecto es el marcador ALDH1 como mecanismo de resistencia a inhibidores tirosín-kinasa. Huang et al¹²¹

demonstraron en líneas celulares de NSCLC con mutación EGFR, que las células ALDH1+ eran más resistentes a gefitinib que las ALDH-. Además, en esta misma publicación, mostraron los datos del análisis del líquido pleural de diez pacientes naive de tratamiento antitumoral, seis resistentes a TKIs y seis resistentes a quimioterapia. Cuando analizaron la expresión de ALDH1, observaron que había una mayor proporción de células ALDH1+ en las muestras de pacientes resistentes a TKI y quimioterapia.

Hasta ahora se habían descrito como mecanismo de resistencia adquirida a TKIs, la activación de PI3K/Akt, la amplificación de MET, y la transición epitelio-mesénquima. Es posible que estemos frente a otra forma de resistencia adquirida a inhibidores tirosin-kinasa, como es la expresión de marcadores de CMT y que la célula tumoral sea capaz de expresarlos en su empeño de evadir a los tratamientos antitumorales.

En el año 2011 Travis et al¹²² publicaron la nueva clasificación de adenocarcinomas de pulmón, en la que, brevemente, se clasifican en:

- Adenocarcinoma in situ: tumores menores de 3 cm con patrón lepidico puro, sin invasión linfática, vascular ni pleural, y sin necrosis tumoral. Se subdivide en mucinoso, no mucinoso y mixto, en función de la presencia o ausencia de mucina intracelular.
- Adenocarcinoma mínimamente invasivo: tumores menores de 3 cm con patrón predominantemente lepidico y con <5 mm de invasión estromal, y sin invasión linfática, vascular ni pleural, y sin necrosis tumoral. Se subdivide en mucinoso, no mucinoso y mixto.

- Adenocarcinoma infiltrante: identificando la infiltración mediante tres parámetros: estroma miofibroblástico activo, invasión linfovascular o pleural y patrón histológico distinto al lepidico. Se clasifican según su patrón predominante en: lepidico (antes CBA, invasión >5mm), acinar, papilar, micropapilar y sólido, y otras variantes (mucinoso, coloide, fetal y enteroide)

Los pacientes con adenocarcinoma in situ tienen una supervivencia libre de enfermedad a los 5 años de un 100%, y aquellos con adenocarcinoma mínimamente invasivo prácticamente también. Además, los adenocarcinomas infiltrantes con patrón predominantemente lepidico tienen un pronóstico muy favorable.

Recientemente se ha publicado que aquellos adenocarcinomas infiltrantes con >50% de patrón lepidico no recaen, los que tienen entre 10-50% de patrón lepidico tienen un riesgo de recidiva intermedia y aquellos con <10% de patrón lepidico tienen el mayor riesgo de recaída¹²³. El porcentaje de patrón lepidico es inversamente proporcional a la extensión del componente invasivo. Por ello, un mayor porcentaje de patrón lepidico se correlaciona con un mejor pronóstico, puesto que la recaída se relaciona con la extensión del patrón infiltrante. Es más, ya hay autores que abogan por un cambio en la clasificación TNM, teniendo en cuenta para el tamaño tumoral únicamente el componente infiltrante.

Entre los patrones de adenocarcinoma infiltrante los que presentan un peor pronóstico son el sólido y el micropapilar.

Acorde con los datos publicados, en nuestra serie de pacientes, aquellos con adenocarcinoma infiltrante con componente lepidico recayeron la mitad que aquellos sin componente lepidico. Además, ninguno de los pacientes con >50% de componente lepidico sufrió una recaída.

Nunca se ha estudiado la relación entre la expresión de ALDH1 y CD133 y la presencia de componente lepidico, ni tampoco con los distintos subtipos de adenocarcinoma. En nuestro análisis, no existe una relación significativa entre la expresión de estos marcadores y el componente lepidico, ni con el predominio de ningún subtipo de adenocarcinoma. Partiendo de la hipótesis de que ALDH1 y CD133 se asocian a un peor pronóstico, cabría de esperar su ausencia en los adenocarcinomas con extenso componente lepidico, pero esto no ha sido demostrado hasta la fecha.

En los últimos meses se han publicado varios trabajos que intentan relacionar los subtipos histológicos de adenocarcinoma según la última clasificación del 2011 y el status mutacional EGFR¹²⁴. Los subtipos que con mayor frecuencia se asocian a mutaciones en EGFR son el adenocarcinoma in situ, el mínimamente invasivo y el infiltrante con patrón predominantemente lepidico. (hasta 60-70%), seguidos por el adenocarcinoma infiltrante con patrón predominantemente acinar y papilar (entorno al 50%). Además, el adenocarcinoma infiltrante mucinoso prácticamente nunca se asocia a mutación en EGFR. Dentro de los adenocarcinomas EGFR wild-type, el patrón predominante es el infiltrante acinar¹²⁵. En consonancia con los datos publicados, en nuestra serie, los subtipos de adenocarcinoma con presencia de mutación EGFR fueron el predominantemente lepidico, el acinar y el papilar.

7. CONCLUSIONES

1. No encontramos co-expresión de ALDH1 y CD133 en ninguno de nuestros pacientes. Por ello, no hemos conseguido identificar CMT en NSCLC estadio I utilizando como marcadores ALDH1 y CD133.
2. ALDH1 en NSCLC estadio I se expresa tanto en el núcleo como en el citoplasma; en el citoplasma existen varios patrones de expresión, entre ellos, en gradiente y difuso. CD133 tiene expresión de membrana de forma difusa. No existe co-expresión entre los dos marcadores.
3. La expresión de ALDH1 en NSCLC estadio I es más frecuente en varones, y dentro del grupo de carcinomas escamosos se asocia a tumores más pequeños. La expresión citoplasmática de ALDH1 no influye en la supervivencia de los pacientes. La expresión nuclear de ALDH1 puede estar relacionada con un mejor pronóstico. La expresión de CD133 se relaciona con una menor tasa de recaídas.
4. ALDH1 y CD133 no se asocian con la presencia de mutaciones en EGFR en adenocarcinomas. Tampoco se asocian con ninguno de los subtipos histológicos de adenocarcinoma ni con la presencia del patrón lepidico.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Mountain CF. A new international staging system for lung cancer. *Chest* 1986; 89:225-233
- ² Harpole DH. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung utilizing presentation histopathology and oncoprotein expression. *Cancer Res* 1995;55:51-56
- ³ Pairolero PC. Postsurgical stage I bronchogenic carcinoma: morbid implications of recurrent disease. *Ann Thorac Surg* 1984;38:331-336
- ⁴ Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *BMJ* 1995;311:899-909
- ⁵ Pisters K. Cancer Care Ontario and American Society of Clinical Oncology. Adjuvant Chemotherapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stages I-IIIa Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer Guideline. *Journal of Clinical Oncology*. Vol 25; 34
- ⁶ Deng S, Yang X, Lassus H, et al. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One*. 2010; 5(4): e10277
- ⁷ Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukaemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997; 3: 730-7
- ⁸ Janikova M, Skarda J, Dziechciarkova M, Radota L, Chmelova J, Kreici V et al. Identification of CD 133+/nestin+ putative cancer stem cells in non-small cell lung cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010 Dec;154(4):321-6
- ⁹ Douville J, Beaulieu R, Balicki D. Aldh1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2009; 18(1):17-25
- ¹⁰ Marcatto P, Dean CA, Pan D, et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells*. 2011;29(1):32-45
- ¹¹ Stroma RW, Trujillo AP, Springer JB, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:9118-23

-
- ¹² . Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1:555-67
- ¹³ Morimoto K, Kim SJ, Tanei T, et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancer are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci*. 2009;100:1062-68
- ¹⁴ Jiang F, Qiu Q, Khanna A, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009;7:330-8
- ¹⁵ Chang B, Liu G, Xue F et al. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Mod Pathol*. 2009; 22:817-22
- ¹⁶ Rasheed ZA, Yang J, Wang Q, et al. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2010;2010;102:340-51
- ¹⁷ Su Y, Qiu Q, Zhan X, et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19:327-37
- ¹⁸ Charape-Jauffret E, Ginestier C, Lovino F, et al. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16:45-55
- ¹⁹ Li T, Su Y, Mei Y, et al. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients outcome. *Lab Invest*. 2010;90:234-44
- ²⁰ Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp Hemtol oncol*. 2013; 2:17
- ²¹ Zhang Y, Wei J, Wang H et al. Epithelial mesenchymal transition correlates with CD23+CD44+ and CD133+ cells in pancreatic cancer. *Oncol Rep* 2012;27:1499-605
- ²² Hong Wu, Xiao-wei Qi, Guang-ning Yan, Qing-bi Zhang, Chuan Xu, Xiu-wu Bian. Is CD133 expression a prognostic biomarker of non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *PLOS one*. 2014;9(6):e100168
- ²³ Nishide K, Nakatani Y, Kiyonari H, Kondo T. Glioblastoma formation from cell population depleted of Prominin1-expressing cells. *PLoS One*. 2009 Aug 31;4(8):e6869
- ²⁴ Adam Giangreco, Karen Groot, Sam Janes. Lung cancer and lung stem cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:547-553

-
- ²⁵ Passegue E, Jamieson CH, Ailler LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci.* 2003; 100:11842-11849
- ²⁶ Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, Goodell M, Brenner MK. A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 101:13228-14223
- ²⁷ Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung YJ. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. *Cancer Res* 67:4827-4833
- ²⁸ Jian F, Qiu Q, Khanna A et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res.* 2009;7:330-338.
- ²⁹ Leung EL, Fiscus RR, Tung JW et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PLoS One* 5:e146062
- ³⁰ Stuelten CH, Mertins SD, Busch JI et al. Complex display of putative tumor stem cell markers in the NCI60 tumor cell line panel. *Stem Cells* 28:649-660
- ³¹ Black WJ, Stagos D, Marchitti SA et al. Human aldehyde dehydrogenase genes: alternatively spliced transcriptional variants and their suggested nomenclature. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2009;19:893-902
- ³² Vasiliou V, Nebert DW. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human Genomics.* 2005;2:128-143
- ³³ Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opinion on Drug Metabolism.* 2008;4:697-720
- ³⁴ Jones RJ, Berber JP, Vala MS et al. Assessment of aldehyde dehydrogenase in viable cells. *Blood.* 1995; 85:2742-2746
- ³⁵ Vaidyanathan G, Song H, Affleck D et al. Targeting aldehyde dehydrogenase: a potential approach for cell labeling. *Nuclear Medicine and Biology.* 2009; 36:919-929
- ³⁶ Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414:105-111
- ³⁷ Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood.* 2006;107:2162-2169

-
- ³⁸ Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population base don aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2006;24:975-985
- ³⁹ Zhou P, Hohm S, Olusanya Y, Hess DA, Nolte JA. Human progenitor cells with high aldehyde dehydrogenase activity efficiently engraft into damaged liver in a novel model. *Hepatology*. 2009;49:1992-2000
- ⁴⁰ Sondergaard CS, Hess DA, Mexwill DJ et al. Human cord blood progenitors with high aldehyde dehydrogenase activity improve vascular density in a model of acute myocardial infarction. *J Transl Med*. 2010;8
- ⁴¹ Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, et al. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2009;113:5340-5351
- ⁴² Muramoto GG, Russell JL, Safi R et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase expands hematopoietic stem cells with radioprotective capacity. *Stem Cells*. 2010;28:523-534
- ⁴³ Durante F. Nesso fisio-pathologico tra la struttura dei nei matemi e la genesi di alcuni tumori maligni. *Arch Memor Observ Chir Pract*. 1874;11:217-226
- ⁴⁴ Lapidot T, Sirard C, Vormoor J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994; 367:645-648
- ⁴⁵ Al-Hajj M, Wicha MS, Benito Hernandez A, Morrison S, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:3983-3988
- ⁴⁶ Yung Su, Qi Qiu, Xingqiao Zhang et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer. *Cancer Epidemiology, biomarkers and prevention*. 2011:327-337
- ⁴⁷ Ting Li, Yung Su, Yuping Mei, Qixin Leng, Bingjie Leng, Zhenqiu Liu et al. ALDH1A1 is a marker of malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients outcome. *Laboratory investigation*. 2009;90:234-244
- ⁴⁸ Clay M, Tabor M, Owen J, Carey T, Bradford C, Wolf G et al. Single marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. 2010;1195-1201

-
- ⁴⁹ Ohi Y, Umakita Y, Yoshioka T, Souda M, Rai Y, Sagara Y et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology*. 2011;59:776-780
- ⁵⁰ Kahlert C, Bergmann F, Beck J, Welsch T, Mogler C, Herpel E et al. Low expression of aldehyde dehydrogenase 1A1 is a prognostic marker for poor survival in pancreatic cancer. *BMC Cancer*. 2011;11:275-285
- ⁵¹ Chang B, Liu G, Xue F, Rosen D, Xiao L, Wang W et al. ALDH1 expression correlates with favorable prognosis in ovarian cancers. *Modern Pathology*. 2009;22:817-823
- ⁵² Lingala S1, Cui YY, Chen X, Ruebner BH, Qian XF, Zern MA, Wu J. Immunohistochemical staining of cancer stem cell markers in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2010 Aug;89(1):27-35.
- ⁵³ Shenoy A, Butterworth E, Huang EH. ALDH as a marker for enriching tumorigenic human colonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 2012;916:373-85.
- ⁵⁴ Yao T, Chen Q, Zhang B, Zhou H, Lin Z. The expression of ALDH1 in cervical carcinoma. *Med Sci Monit*. 2011;17(8):21-26
- ⁵⁵ Ginisteir C, Hur MH, Charafe-Jauffret E et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007;1:555-567
- ⁵⁶ Li T, Su Y, Mei Y et al. ALDH1A1 is a marker for malignant prostate stem cells and predictor of prostate cancer patients outcome. *Laboratory Investigation*. 2010;90:234-244
- ⁵⁷ Deng S, Yang X, Lassus H et al. Distinct expresion levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoforma 1 (ALDH1) in human epithelial cancers. *PloS One*. 2010;5:e10277
- ⁵⁸ Rasheed ZA1, Yang J, Wang Q, Kowalski J, Freed I, Murter C et al. Prognostic significance of tumorigenic cells with mesenchymal features in pancreatic adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2010 3;102(5):340-51.
- ⁵⁹ Tonge PD, Andrews PW. Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner. *Differentiation*. 2010;80:20-30
- ⁶⁰ Ginestier C, Wicinski J, Cervera N et al. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle*. 2009;8:3297-3302

-
- ⁶¹ Moreb JS, Gabr A, Vartikar GR, Gowda S, Zucali J, Mohuczy D. Retinoic acid down-regulates aldehyde dehydrogenase and increases cytotoxicity of 4-hydroperoxycyclophosphamide and acetaldehyde. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;312:339-345
- ⁶² Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chemico Biological Interactions*. 2003;143-144:201-210
- ⁶³ Deak KL, Dickerson ME, Linney E et al. Analysis of ALDH1A2, CTYP26A1, CYP26B1, CRABP1 and CRABP2 in human neural tube defects suggests a possible association with alleles in ALDH1A2. *Birth Defects Research. Part A: Clinical and Molecular Teratology*. 2005;73:868-875
- ⁶⁴ Minami J, Todoroki M, Ishimitsu T et al. Effects of alcohol intake on ambulatory blood pressure, heart rate, and heart rate variability in Japanese men with different ALDH2 genotypes. *Journal of Human Hypertension*. 2002; 16:345-351
- ⁶⁵ Rizzo WB. Sjogren-Larsson syndrome: molecular genetics and biochemical patogenesis of fatty aldehyde dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2007;90:1-9
- ⁶⁶ Mills PB, Footitt EJ, Mills KA et al. Genotypic and phenotypic spectrum of pyridoxine-dependent epilepsy (ALDH7A1 deficiency). 2010; 133:2148-2159
- ⁶⁷ Hilton J. Role of aldehyde dehydrogenase in cyclophosphamide-resistant L1210 leukemia. *Cancer Research*. 1984;44:5156-5160
- ⁶⁸ Tanei T, Morimoto K, Shimazu K et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clinical Cancer Research*. 2009;15:4234-4241
- ⁶⁹ Kitahara O, Katagiri T, Tsunoda T, Harima Y, Nakmura Y. Classification of sensitivity or resistance of cervical cancers to ionizing radiation according to expression profiles of 62 genes selected by cDNA microarray analysis. *Neoplasia*. 2002;4:295-303
- ⁷⁰ Levi BP, Yilmaz OH, Duester G, Morrison SJ. Aldehyde dehydrogenase 1A1 is dispensable for stem cell function in the Mouse hematopoietic and nervous system. *Blood*. 2009;113:1670-1680

-
- ⁷¹ Chule JP, Muramoto GG, Whitesides J et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:11707-11712
- ⁷² Tallman MS, Andersen JW, Schiffer Ca, et al. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 1997;337:1021-1028
- ⁷³ Ma Irene, Allan A. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev and Rep*. 2011;7:292-306.
- ⁷⁴ Croker AK, Allan AL. All-trans retinoic acid reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44+ breast cancer cells. *AACR Adv in Breast Can Meeting*. 2009;Abstract
- ⁷⁵ Arrieta O, González-de la Rosa C, Aréchaga-Ocampo E, Villanueva-Rodríguez G, et al. Randomized phase II trial of all-Trans-Retinoic acid with chemotherapy base don paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. 2010;28:3463-3471
- ⁷⁶ Okudela K, Woo T, Mitsui H, Suzuki T, Tajiri M, Sakuma Y et al. Downregulation of ALDH1A1 expression in non-small cell lung carcinomas-its clinicopathologic and biological significance. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(1):1-12
- ⁷⁷ Singh R, Sandhu J, Kaur B, Juren T, Steward WP, Segerbeck D, Farmer PB. Evaluation of the DNA damaging potential of cannabis cigarette smoke by the determination of acetaldehyde derived N2-ethyl-2'-deoxyguanosine adducts. *Chem Res Toxicol* 2009;22:1181-1188
- ⁷⁸ Sullivan J, Spinola M. Dodge M, Raso M, Behrens C, Gao B et al. Aldehyde dehydrogenase activity selects for lung adenocarcinoma stem cell dependent on Notch signaling. *Cancer Res*. 2010;70(23):9937-9948
- ⁷⁹ Li X, Wan L, Geng J, Wu C, Bai X. Aldehyde dehydrogenase 1A1 possesses stem-like properties and predicts lung cancer patient outcome. *Journal of Thoracic Oncology*. 2012;7(8):1235-1245
- ⁸⁰ Zenke Y, Ishii G, Ohe Y, Kaseda K, Yoshida T, Matsumoto S et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression in cancer cells could have prognostic value for patients with non-small cell lung cancer who are treated with neoadjuvant therapy: identification of prognostic microenvironment factors after chemoradiation. *Pathology International*. 2013;63:599-606

-
- ⁸¹ Alamgeer M, Ganju V, Szcepny A, Russell P, Prodanovic Z, Kumar B et al. The prognostic significance of aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1) and CD133 expression in early stage non-small cell lung cancer. *Thorax*. 2013;68:1095-1104
- ⁸² Okudela K, Woo T, Mitsui H, Tajiri M, Masuda M, Ohashi K. Expression of the potential cancer stem cell markers CD133, CD44, ALDH1 and B-catenin, in primary lung adenocarcinoma-their prognostic significance. *Pathology International*. 2012;62:792-801
- ⁸³ Mizrak D, Brittan M, Aison MR. CD133; molecule of the moment. *J Pathol*. 2008;214:3-9
- ⁸⁴ Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Blood*, 1997, 90 (12):5002-5012.
- ⁸⁵ de Wynter EA, Buck D, Hart C, et al. CD34 + AC133 + cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID re-populating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells*, 1998, 16(6):387-396
- ⁸⁶ Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, et al. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7 [J]. *Blood*, 2000, 95(9):2813-2820
- ⁸⁷ Bitan M, Shapira MY, Resnick IB, et al. Successful transplantation of haploidentically mismatched peripheral blood stem cells using CD133 + purified stem cells [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33(6):713-718.
- ⁸⁸ Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, et al. Expression of VEGFR2 and AC133 by circulating human CD34 (+) cells identifies a population of functional endothelial precursors.[J]. *Blood*, 2000, 95(3):952-958.
- ⁸⁹ Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(26): 14720-14725.
- ⁹⁰ Corbeil D, R?per K, Hellwig A, et al. The human AC133 hematopoietic stem cell antigen is also expressed in epithelial cells and targeted to plasma membrane protrusions. *J Biol Chem*, 2000, 275(8):5512-5520
- ⁹¹ Richardson GD, Robson CN, Lang SH, et al. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci*, 2004, 117(16): 3539-3545.
- ⁹² Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, et al. Human circulating AC133 + stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*, 2004, 114(2):182-195.

-
- ⁹³ Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003, 63(18):5821-5828.
- ⁹⁴ Olempska M, Eisenach PA, Ammerpohl O, et al. Detection of tumor stem cell markers in pancreatic carcinoma cell lines. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(1):92-97.
- ⁹⁵ Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(3):313-323.
- ⁹⁶ O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice [J]. *Nature*, 2007, 445(7123):106-110.
- ⁹⁷ Yin S, Li J, Hu C, et al. CD133 positive hepatocellular carcinoma cells possess high capacity for tumorigenicity. *Int J Cancer*, 2007, 120(7): 1444-1450.
- ⁹⁸ Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Virgilio A et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15:504-514
- ⁹⁹ Wu H. Qi X, Yan G, Zhang Q, Xu C and Bian X. Is CD133 expression a prognostic biomarker of non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *PLOS One*. 2014;9(6):
- ¹⁰⁰ Wang W, Chen Y, Deng J, Zhou J, Zhou Y and Wang S. The prognostic value of CD133 expression in non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Tumor Biol*. 2014
- ¹⁰¹ Tan Y, Chen B, Xu W, Zhao W and Wu J. Clinicopathological significance of CD133 in lung cancer: a meta-analysis. *Mol and Clin Oncol*. 2014;2:111-115
- ¹⁰² Li F, Zeng H and Ying K. The combination of stem cell markers CD133 and ABCG2 predicts relapse in stage I non-small cell lung carcinomas. *Med Oncol*. 2011;28:1458-1462
- ¹⁰³ Woo T, Okudela K, Mitsui H, Yazawa T, Ogawa N, Tajiri M et al. Prognostic value of CD133 expression in stage I lung adenocarcinomas. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(1):32-42
- ¹⁰⁴ López-González A, Salas C, Provencio M, Córdoba M, Gamallo C. Aldehyde dehydrogenases in early stage lung cancer: nuclear expression. *Clin Transl Oncol*. 2014;16(10):931-4

-
- ¹⁰⁵ Stagos D et al. Corneal Aldehyde Dehydrogenases: multiple functions and novel nuclear localization. *Brain Res Bull.* 2010;15:21-218
- ¹⁰⁶ Patel M, Lu L, Zander DS, Sreerama L, Coco D and Moreb JS. ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors. *Lung Cancer.* 2008;59:340-349
- ¹⁰⁷ Kim H, Lapointe J, Kaygusuz G, Ong De, Li C, van de Rijn M et al. The retinoic acid synthesis gene ALDH1A2 is a candidate tumor supresor in prostate cancer. *Cancer Res* 2005;65:8118-8124
- ¹⁰⁸ Dimou A, Neumeister V, Agarwai S, Anagnostou V, Syrigos K y Rim D. Measurement of aldehyde dehydrogenase 1 expression defines a group with better prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *AJP.* 2012;181(4):1436-1442
- ¹⁰⁹ Ji H, Li D, Chen L, et al. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vitro sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell.* 2006;9:485-95
- ¹¹⁰ Politi KI, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGFR receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* 2006;20:1496-51
- ¹¹¹ Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al.; Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Français de Pneumo-Cancérologie and Associazione Italiana Oncologia Toracica. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:239–246.
- ¹¹² Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, et al.; West Japan Oncology Group. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121–128.
- ¹¹³ Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004 May 20;350(21):2129-39.

-
- ¹¹⁴ Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I et al. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 7;101(36):13306-11.
- ¹¹⁵ Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1497-500.
- ¹¹⁶ Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:947-57
- ¹¹⁷ Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med*. 2010;362:2380-88
- ¹¹⁸ Zhou C, Wu YL, Chen G et al. Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL): a multicenter, open-label, randomized, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2011;29:3567-73
- ¹¹⁹ D'Angelo SP, Janjigian Y, Ayhe N, Riely G, Craft J, Sima C et al. Distinct Clinical Course of EGFR-Mutant Resected Lung Cancers. Results of Testing of 1118 Surgical Specimens and Effects of Adjuvant Gefitinib -and Erlotinib. *J Thorac Oncol*. 2012;7(12):1815-1822
- ¹²⁰ Izar B , Sequist L, Lee M, Muzikansky A, Heist R, Iafrate J. The impact of EGFR mutation status on outcomes in patients with resected stage I non-small cell lung cancers. *Ann Thorac Surg* 2013;96:962-8
- ¹²¹ Huan C, Tsai M, Chang T, Tang W, Chen S, Lai H et al. ALDH-positive lung cancer stem cells confer resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Cancer letters*. 2013;144-151
- ¹²² Travis W, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson A, Geisinger K, Yatabe Y et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung adenocarcinoma. *J Thor Oncol*. 2011;6:244-285
- ¹²³ Kadota K, Villena-Vargas J, Yoshizawa A, Motoi N, Sima C et al. Prognostic significance of adenocarcinoma in situ, minimally invasive adenocarcinoma and nonmucinous lepidic predominant invasive adenocarcinoma of the lung in patients with stage I disease. *Am J Surg Pathol*. 2014;38:448-460

¹²⁴ Yanagawa N, Shiono S, Abiko M, Ogata S, Sato T, Tamura G. The correlation of the International Association for the Study of the Lung Cancer (IASLC)/American Thoracic Society (ATS)/European Respiratory Society (ERS) Classification with prognosis and EGFR mutation in Lung Adenocarcinoma. Ann Thorac Surg. 2014

¹²⁵ Villa C, Cagle P, Johnson M, Patel J, Yeldandi A, Raj R et al. Correlation of EGFR mutation status with predominant histologic subtype of adenocarcinoma according to the new Lung Adenocarcinoma Classification of the International Association for the study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society.